

04.11.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 6月 3日

出願番号
Application Number: 特願2004-165919

[ST. 10/C]: [JP2004-165919]

出願人
Applicant(s): 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

REC'D 04 MAY 2005
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-025
【提出日】 平成16年 6月 3日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県明石市大蔵谷奥 15-10
 【氏名】 西田 康宏
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市東淀川区東淡路 4-27-2
 【氏名】 米虫 節夫
【発明者】
 【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所内
 【氏名】 三沢 典彦
【発明者】
 【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所内
 【氏名】 笠井 宏朗
【発明者】
 【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所内
 【氏名】 志津里 芳一
【発明者】
 【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所内
 【氏名】 足立 恭子
【特許出願人】
 【識別番号】 591001949
 【氏名又は名称】 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所
 【代表者】 柳沢 満則
【代理人】
 【識別番号】 100107870
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 野村 健一
 【電話番号】 045-290-7480
 【連絡先】 担当
【選任した代理人】
 【識別番号】 100098121
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 間山 世津子
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-388165
 【出願日】 平成15年11月18日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 126469
 【納付金額】 16,000円
【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成16年度新エネルギー・産業技術総合開発機構、ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライプラリーの構築、産業活力再生特別措置法第30条の

適用を受けるもの)

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0314503

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

以下の(a)、(b)、又は(c)に示すペプチド：

(a) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

(c) 配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

【請求項2】

以下の(a)、(b)、又は(c)に示すペプチドをコードする遺伝子：

(a) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

(c) 配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

【請求項3】

請求項2に記載の遺伝子を導入して得られる微生物であって、 β -イオノン環の2位の炭素に水酸基を導入できる微生物。

【請求項4】

請求項2に記載の遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる微生物であって、 β -イオノン環の2位の炭素に水酸基を導入できる微生物。

【請求項5】

他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする請求項4に記載の微生物。

【請求項6】

微生物が大腸菌であることを特徴とする請求項3乃至5に記載の微生物。

【請求項7】

請求項3乃至6に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体から β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドを得ることを特徴とする、水酸化されたカロテノイドの製造法。

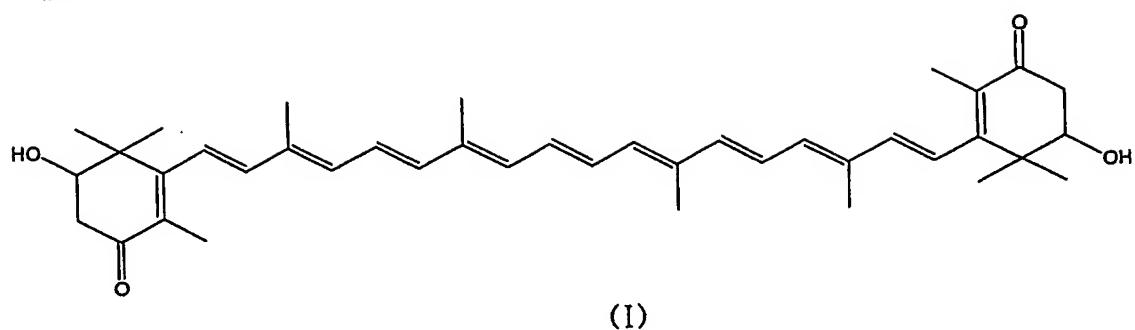
【請求項8】

β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドが、 β , β -カロテン-2-オール(2-ヒドロキシ- β -カロテン)、 β , β -カロテン-2, 2'-ジオール(2, 2'-ジヒドロキシ-2-ヒドロキシ- β -カロテン)、カロキサンチン(2-ヒドロキシゼアキサンチン)、ノストキサンチン(2-カロテン)、カロキサンチン(2-ヒドロキシゼアキサンチン)、2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4, 4'-ジオール(2, 2'-ジヒドロキシカントキサンチン)、2, 2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4, 4'-ジオル(2, 2'-ジヒドロキシカントキサンチン)、2-ヒドロキシアスタキサンチン、2, 3, 2', 3'-テトラヒドロキシ- β , β -カロテン-4, 4'-ジオル(2, 2'-ジヒドロキシアスタキサンチン)であることを特徴とする請求項7に記載の水酸化されたカロテノイドの製造法。

【請求項9】

下記の化学構造式(I)で示される2, 2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4, 4'-ジオル(2, 2'-ジヒドロキシカントキサンチン)。

【化1】



【書類名】明細書

【発明の名称】新規なカロテノイドヒドロキシラーゼ遺伝子及び水酸化されたカロテノイドの製造法

【技術分野】

[0 0 0 1]

本発明は、 β -イオノン環を有するカロテノイドの2位(2'位)の炭素に水酸基を導入する新規な酵素、それをコードする遺伝子、この遺伝子を導入した微生物に関するものである。また、この遺伝子が導入された微生物を利用して、 β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドの製造法に関するものである。

【背景技术】

[0002]

カロテノイド (carotenoid、カロチノイドとも呼ばれる) は、炭素鎖が40のイソブレン骨格からなる自然界に豊富に存在する色素の総称である。現在までに600種以上のカロテノイドが単離されている (Pfander, H., ed., *Key to Carotenoids*, Basel, Birkhauser, 1987)。最近ではカロテノイドの持つ種々の癌 (がん) 等の慢性病に対する予防効果が注目されており、数多くの報告がなされている (たとえば、西野輔翼, 村越倫明, 矢野昌充, *Food Style* 21, 4, 53-55, 2000; Nishino, H. et al, *Carotenoids in cancer chemoprevention. Cancer Metastasis Rev.* 21, 257-264, 2002; Mayne, S.T., β -Carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.*, 10, 690-701, 1996 参照)。

[0 0 0 3]

カロテノイドは多様な種類からなるにもかかわらず、現在までに癌の予防試験（ヒト投与試験、動物投与試験等）に使われてきたカロテノイドの種類はごく限られたものであつた。それらのカロテノイドは、 β -カロテン（ β -carotene、 β -カロチンとも呼ばれる：化学合成品）、リコ펜（lycopene、リコピンとも呼ばれる：トマトから抽出）、 α -カロテン（ α -carotene、 α -カロチンとも呼ばれる：パーム油から抽出）、ルテイン（lutein：マリー・ゴールドから抽出、または化学合成品）、アスタキサンチン（astaxanthin：オキアミ、Haematococcus属藻類から抽出、または化学合成品）、フコキサンチン（fucoxanthin：食用海藻から抽出）、 β -クリプトキサンチン（ β -cryptoxanthin：温州ミカンより抽出）等である。これらの色素を用いた癌予防試験の結果、カロテノイドの癌予防効果は、カロテノイドの種類によって異なることが明らかとなってきた。一例として、国立がんセンター研究所の高須賀伸夫らが行ったマウスを用いた実験結果（1996年カロテノイド研究談話会報告）の高須賀伸夫らが行ったマウスを用いた実験結果（1996年カロテノイド研究談話会報告）の発生率は、カロテノイドを投与し示したい。肺癌（ddyマウス肺二段階発癌モデル）の発生率は、カロテノイドを投与しないコントロールマウスを100%とすると、リコペンまたは α -カロテン投与マウスが40%、ルテインまたはアスタキサンチン投与マウスが70%、 β -カロテン投与マウスが139%の癌発生率であった。肝臓癌（マウス自然肝臓癌発癌モデル）の発生率は、同じくカロテノイドを投与しないコントロールマウスを100%とすると、アスタキサンチンまたはフコキサンチン投与マウスが30%、 α -カロテンまたはルテイン投与マウスが50%、 β -カロテン投与マウスが70%、リコペン投与マウスが100%の癌発生率であった。皮膚癌（マウス皮膚癌発癌モデル）の発生率は、同じくカロテノイドを投与しないコントロールマウスを100%とすると、フコキサンチンまたはリコペン投与マウスが10%、アスタキサンチン投与マウスが100%の癌発生率であった。これら3つの発癌モデルの結果を比較すると、肺癌マウスが100%の癌発生率であった。これら3つの発癌モデルの結果を比較すると、肺癌や皮膚癌の抑制で効果が高かったリコペンの効果が肝臓癌の抑制には効果が無いこと、肝臓癌の抑制で効果が高かったアスタキサンチンの効果が皮膚癌の抑制には効果が無いこと等がわかる。さらに、疫学試験や臨床試験の結果、前立腺癌を予防するカロテノイドは、食事で摂取するカロテノイドの中で、リコペンのみという結果が報告されている（Giovanni, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willet, W. C., Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. J. National Cancer Institute 87, 1767-1776, 1995; Vogt, T.M. et al, Serum lycopene, other serum carotenoids, and risk of prostate cancer in US Blacks and Whites

Am. J. Epidemiol. 155, 1023-1032, 2002参照）。また最近、 β -クリプトキサンチンの肺癌予防効果が高いことが明らかにされつつある (Yuan, J.M., Stram, D.O., Arakawa, K., Lee, H.P. and Yu M.C., Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 12, 890-898, 2003; Mannisto, S. et al, Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, 40-48, 2004参照）。さらに癌の予防効果以外にも、循環器系の慢性病、白内障や他の眼の慢性病、骨粗鬆症等の慢性病の予防に効果がある可能性が高いことが報告されている。たとえば、眼の慢性病（黄斑変性症(age-related macular degeneration)や白内障など）に効果が期待できるカロテノイドは、食事で摂取するカロテノイドの中で、ルテインとゼアキサンチンのみという結果が報告されている (Semba, R.D. and Dagnelie, G., Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? Med. Hypotheses 61, 465-472, 2003; Mazaffarieh, M., Sacu, S. and Wedrich, A., The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: A review based on controversial evidence. Nutr. J., 2, 20, 2003参照）。

【0004】

以上の結果は、600種類以上あるカロテノイドの中で、実際に動物個体を用いたレベル以上の研究で、癌等の慢性病の予防効果が検討されているものは、高々10種類に満たないということ、それにもかかわらず、カロテノイドの癌等の慢性病に対する予防効果にはカロテノイドの個性が認められるということを示している。実際に検討されてきたカロテノイドの種類が少ないとこの最大の原因は、多量に抽出、精製、または化学合成できるカロテノイドの種類が上記のものに限られているということであると考えられる。

【0005】

上記の問題を解決するための有力な手段として、カロテノイド生合成遺伝子を組み込んだ酵母や大腸菌等で目的とするカロテノイドを多量生産する方法が考えられる。たとえば、キリンビールの島田らは、本来カロテノイドを生合成できない食用酵母 $Candida$ ・ユーティリス (*Candida utilis*) に、カロテノイド生合成遺伝子群を導入・発現させて、リコ펜を7.8 mg/g (乾重量) 合成させるのに成功した (Shimada, H., Kondo, K., Fraser, P. D., Miura, Y., Saito, T., and Misawa, N., Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isopreno id pathway. Appl. Environ. Microbiol., 64, 2676-2680, 1998)。この遺伝子組換え法によれば、種々の生合成遺伝子の組み合わせにより、これまで自然界に存在が認められていなかつたか、ごく微量しか存在していなかつたようなカロテノイドをも多量生産することが可能となる。たとえば、日本医科大学の高市らは、これまでナマズに微量存在しているという報告しかなかつたパラシロキサンチン (parasiloxanthin) を組換え大腸菌で主要カロテノイド産物として生産した (Takaichi, S., Sandmann, G., Schnurr, G., Satomi, Y., Suzuki, A., and Misawa, N. The carotenoid 7,8-dihydro- Ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. Eur. J. Biochem., 241, 291-296, 1996)。また、今まで自然界に報告が無かつた“非天然型”のカロテノイドであるアスタキサンチン- β -ジグルコシド (astaxanthin- β -diglucoside) を組換え大腸菌で合成させたという報告もある (Yokoyama, A., Shizuri, Y., and Misawa, N., Production of new carotenoids, astaxanthin glucosides, by *Escherichia coli* transformants carrying carotenoid biosynthetic genes. Tetrahed. Lett., 39, 3709-3712, 1998)。

【0006】

各種のカロテノイド生産用組換え微生物の作製に最も広く利用されてきたカロテノイド生合成遺伝子は、エルウィニア (*Erwinia*) 属細菌 [エルウィニア・ウレドボラ (*Erwinia uredovora*) 等] 由来のものである。エルウィニア属細菌から取得された遺伝子は、crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ、crtX の6遺伝子であり、これらの遺伝子がコードする生合成酵

素 (CrtE、CrtB、CrtI、CrtY、CrtZ、CrtX) の機能は図1に示されている (非特許文献1 参照)。アスタキサンチンを生合成させたい場合は、さらに、海洋細菌であるパラコッカス (Paracoccus) 属細菌 [Paracoccus sp. MBIC 01143 (Agrobacterium aurantiacum) 等] 由来の crtW 遺伝子が必要である (図1)。パラコッカス属細菌からは、crtB、crtI、crtY、crtZ、crtW の5遺伝子が単離されている (非特許文献1 参照)。crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子の機能は両細菌で共通である。エルウェニア属細菌またはパラコッカス属細菌の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を導入・発現させた大腸菌は β -カロテンを合成するが、これにさらに海洋細菌由来の crtW 遺伝子と、エルウェニア属細菌またはパラコッカス属細菌由来の crtZ 遺伝子を導入・発現させると、その組換え大腸菌はアスタキサンチンを合成するようになる。さらに、このアスタキサンチンを合成する大腸菌にエルウェニア属細菌の crtX 遺伝子を導入・発現させると、その組換え大腸菌は“非天然型”のアスタキサンチン- β -ジグルコシドを合成するようになる (図1)。

【0007】

以上述べてきたように、自然界に微量しか存在しない“レア”カロテノイドや存在が確認されていなかった“非天然型”のカロテノイドを大腸菌等の微生物に多量生産させるために、カロテノイド生合成遺伝子を利用することができる事が可能であることが示されつつある。一方、現在までにクローニングされ機能解析された、この目的のために使用できるカロテノイド生合成遺伝子の種類は25種類と限られている。それらの遺伝子は、crtM (デヒドロスクアレンシンターゼ)、crtE (gps, al-3) (ゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ)、crtB (psy, al-2) (フィトエンシンターゼ)、crtN (デヒドロスクアレンデサチュラーゼ)、crtP (pds1) (フィトエンデサチュラーゼ: 2つの二重結合付加)、crtQ (zds) (β -カロテンデサチュラーゼ: 2つの二重結合付加反応)、crtI (Rhodobacter 属細菌由来 β -カロテンデサチュラーゼ: 3つの二重結合付加反応と cis-trans 異性化反応)、crtI (フィトエンデサチュラーゼ: 4つの二重結合付加反応と cis-trans 異性化反応)、al-1 (フィトエンデサチュラーゼ: 5つの二重結合付加反応と cis-trans 異性化反応)、crtY (crtL- β) (リコペン β -シクラーゼ)、crtL- ϵ (リコペン ϵ -シクラーゼ)、crtYm (リコペン β -モノシクラーゼ)、crtU (β -カロテンデサチュラーゼ)、crtZ (β -カロテンヒドロキシラーゼ; β -C3-ヒドロキシラーゼ)、crtW (bkt) (β -カロテンケトラーゼ; β -C4-オキシゲナーゼ)、crtO (Synechocystis sp. PCC6803由来のもの) (β -カロテンモノケトラーゼ)、crtX (ゼアキサンチングルコシルトランスフェラーゼ)、crtC (ヒドロキシノイロスピレンシンターゼ)、crtD (メトキシノイロスピレンデサチュラーゼ)、crtF (ヒドロキシノイロスピレン α -メチルトランスフェラーゼ)、crtA (スフェロイデンモノオキシゲナーゼ)、crtEb (リコペンエロンガーゼ)、crtYe/Yf (デカブレノキサンチンシンターゼ)、zep1 (ゼアキサンチングルコシダーゼ)、及び、ccs (カプサンチン/カプソルビンシンターゼ) である (Lee, P.C. and Schmidt-Dannert, C., Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 1-11, 2002; Teramoto, M., Takaichi, S., Inomata, Y., Ikenaga, H. and Misawa, N. Structural and functional analysis of a lycopene β -monocyclase gene isolated from a unique marine bacterium that produces myxol. FEBS Lett. 545, 120-126, 2003 参照)。多様なカロテノイドを大腸菌等の微生物に生産させるためには、新規のカロテノイド生合成遺伝子を単離する必要がある。しかしながら、新規のカロテノイド生合成遺伝子のクローニングは遅々として進まないのが現状であった。たとえば、自然界に最も豊富に存在するカロテノイドは β -イオノン環 (β 環) を有するカロテノイド (図1では、 β -カロテン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン等) であるが、 β -イオノン環を酸化する酵素遺伝子は、 β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ (β -C3-hydroxylase) (CrtZ) と β -イオノン環-4-ケトラーゼ (β -C4-ketolase) (CrtW) をコードする遺伝子しか得られていない。これらの酵素遺伝子は、crtZ が1990年に、crtW が1995年に早々と取得され機能解析されている。 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ遺伝子は、ノストキサンチン (nostoxanthin) 等の、 β -イオノン環における2位の炭素が水酸化されたカロテノイドの合成に必要であると考えら

れるが、そのようなカロテノイドの產生微生物はいくつか存在するにもかかわらず（非特許文献2参照）、酵素や遺伝子に関する知見は全く無いのが現状であった。新規のカロテノイド生合成遺伝子のクローニングが難しい理由は、大腸菌における発現クローニング法や既存のカロテノイド遺伝子との相同性を利用したクローニング法により得られるカロテノイド生合成遺伝子はすでに取得されてしまっており、残りの遺伝子は、これらのクローニング法によっては得られないものばかりであるからと考えられる。

【0008】

炭素と水素からのみなるカロテノイドはカロテンと、それに水酸基やケト基などの酸素を含む官能基が導入されたカロテノイドはキサントフィルと呼ばれる。カロテンとキサントフィルとは物性が大きく異なっており、生体内における生理活性もかなり異なっている。たとえば、 β -カロテンの3位の炭素に水酸基が1つ導入されたカロテノイドは β -クリプトキサンチンであるが、これらを摂取した時の生体内の取り込み率は、後者の方が10倍高いことが知られている。また、 β -クリプトキサンチンは最近、日本で特に注目を集めていいるカロテノイドであり、大腸癌、喫煙者の肺癌、子宮頸部癌、食道癌、前立腺癌、リウマチ、骨粗鬆症の予防に効果があるというデータが得られつつある（矢野 昌充、2003年カロテノイド研究談話会報告、及び、前述のYuan, J.M., Stram, D.O., Arakawa, K., Lane, H.P. and Yu M.C., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 890-898, 2003及びManiago, S. et al, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 40-48, 2004）。そのような効果は β -カロテンでは認められていない。また、 β -カロテンの3(3')位の両方の炭素に水酸基が2つ導入されたカロテノイドはゼアキサンチン（図1参照）であるが、一部前述したように、ゼアキサンチンの生理活性は β -クリプトキサンチンとは異なることも知られている。また、ゼアキサンチンの4(4')位の両方のメチレン基が2つともケト基に変換されたカロテノイドはアスタキサンチン（図1参照）であるが、アスタキサンチンの癌予防における生理活性も β -カロテンと大きく異なることは一部前述したとおりであり、ゼアキサンチンの2(2')位の両方の炭素に水酸基がさらに2つ導入されたカロテノイドはノストキサンチンである。一般的に、ノストキサンチンのように、 β -イオノン環の2(2')位の炭素に水酸基が導入されたカロテノイドは、自然界に微量しか存在しなく、多量生産することが不可能であり、したがって、種々の癌等の慢性病予防試験の実施もできなかった。

【非特許文献1】 Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.*, 177, 6575-6584, 1995

【非特許文献2】 Yokoyama, A., Miki, W., Izumida, H., and Shizuri, Y., New trihydroxy-keto-carotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. *Biosci. Biotech. Bioche.*, 60, 200-203, 1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、 β -イオノン環の2位を水酸化する酵素（ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ）をコードする遺伝子を取得することである。そして更に、この遺伝子を導入・発現させた組換え微生物を利用した、 β -イオノン環の2位が水酸化されたカロテノイド（2-ヒドロキシアスタキサンチンやノストキサンチン等）の製造法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、海洋細菌プレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212株 (MBIC 03018) が、2-ヒドロキシアスタキサンチンや2-ヒドロキシアドニキサンチン等の、 β -イオノン環における2位が水酸化されたカロテノイドを作ることができることに着目した。銳意研究を重ねた結果、本海洋細菌より、 β -イオノン環の2位を水酸化する酵素（ β -イ

オノン環-2-ヒドロキシラーゼ）をコードする遺伝子を世界で初めて取得することに成功した。

【0011】

まず、ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを用いて、大腸菌におけるコスミドライプラリーを作製した。カロテノイドを产生するエルウィニア (*Erwinia*) 属細菌 [エルウィニア・ウレドボラ (*Erwinia uredovora*) 等] の染色体DNAを用いて、大腸菌におけるコスミドライプラリーを作製する場合は、この段階で、プレート上で黄色のコロニー（カロテノイド产生大腸菌）が得られるので、簡単にカロテノイド生合成遺伝子群を取得することができる。しかしながら、ブレバンディモナス属SD-212株のコスミドライプラリーからは、色の変化した大腸菌は全く得られなかった。そこで次に、エルウィニア・ウレドボラ由来の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子（図1参照）が導入されてゼアキサンチンを作る大腸菌（黄色コロニー）を宿主として用いて、この組換え大腸菌においてブレバンディモナス属SD-212株のコスミドライプラリーを作製した。このコスミドライプラリーにおいて外見上、色が変化したものは得られなかったので、700株培養し、HPLC-PDA（フォトダイオードアレイ検出器）を用いて、コントロールのゼアキサンチンに加えて、新たなカロテノイドが生成していないかどうかの検討を行った。その結果、新たなカロテノイドを合成するものは全く得られなかった。したがって、ブレバンディモナス属SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子の発現クローニングは不可能であると結論した。

【0012】

次に、フィトエンデサチュラーゼ (crtI) 遺伝子がカロテノイド产生細菌間で2つの保存領域を有していることを見出し、PCR用プライマーを設計した。このプライマーを用いて、ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを鋳型としたPCRを行ったところ、1.1 kb のDNA断片が増幅された。この配列の塩基配列を決定したところ、crtIの部分配列であることがわかった。このcrtI部分配列断片をプローブとして、SD-212株のコスミドライプラリーを用いたコロニーハイブリダイゼーション (colony hybridization) 法を行ったところ、数個の陽性コロニーが得られた。陽性コロニーからプラスミドDNAを調製し、サザンハイブリダイゼーション (Southern hybridization) 法を行い、陽性の12 kbのEcoRIのDNA断片を得た。この12 kbのEcoRI断片の塩基配列を決定したところ、幸運なことに、この断片内にカロテノイド生合成遺伝子群 [既存のcrt遺伝子 (6個) 又はidi遺伝子 (1つ) とホモロジーがあるORF (オープンリーディングフレーム、open reading frame) が7つ] が存在することが明らかとなった。また、この12 kbのEcoRI断片内には、未知のORFが5つが存在するところが明らかとなった。また、この12 kbのEcoRI断片内には、未知のORFが5つが存在していた。これら12個のORFすべてを、大腸菌ベクター-pUC18におけるlac遺伝子のプロモータの利用とLacZのリーダ配列を利用した融合タンパク質法により大腸菌で強制発現させるためのコンストラクトを作製した。そして、エルウィニア属細菌またはパラコッカス属細菌のcrt遺伝子の利用により各種カロテノイドを产生する大腸菌を宿主として、これらの12個のORFの機能解析を行った。その結果、既存のカロテノイド生合成 (crt) 遺伝子とホモロジーがあった6個のORFは予想通りの機能を有するカロテノイド生合成 (crt) 遺伝子であることがわかった。そして、未知のORFのうちの1つ (ORF11) が β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子であることを突き止め、本発明を完成するに至ったのである。

【0013】

本発明は以上のような知見を基に完成されたものである。

【0014】

即ち、本発明は、以下の（1）～（9）を提供するものである。

（1）以下の（a）、（b）、又は（c）に示すペプチド：

（a）配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

（b）配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

（c）配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェント

な条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

(2) 以下の(a)、(b)、又は(c)に示すペプチドをコードする遺伝子：

(a) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

(c) 配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

(3) (2)に記載の遺伝子を導入して得られる微生物であって、 β -イオノン環の2位の炭素に水酸基を導入できる微生物。

(4) (2)に記載の遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる微生物であって、 β -イオノン環の2位の炭素に水酸基を導入できる微生物。

(5) 他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする(4)に記載の微生物。

(6) 微生物が大腸菌であることを特徴とする(3)乃至(5)に記載の微生物。

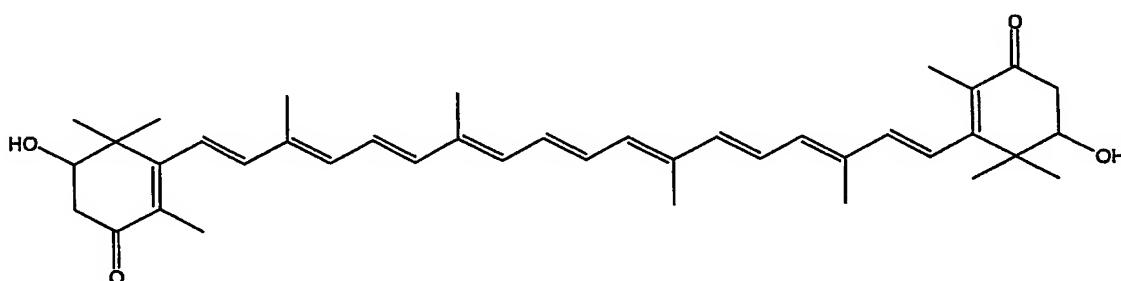
(7) (3)乃至(6)に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体から β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドを得ることを特徴とする、水酸化されたカロテノイドの製造法。

(8) β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドが、 β , β -カロテン-2-オール(2-ヒドロキシ- β -カロテン)、 β , β -カロテン-2,2'-ジオール(2,2'-ジヒドロキシ- β -カロテン)、カロキサンチン(2-ヒドロキシゼアキサンチン)、ノストキサンチン(2,2'-ジヒドロキシゼアキサンチン)、2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン(2-ヒドロキシカンタキサンチン)、2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン(2,2'-ジヒドロキシカンタキサンチン)、2-ヒドロキシアスタキサンチン、2,3,2',3'-テトラヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン(2,2'-ジヒドロキシアスタキサンチン)であることを特徴とする(7)に記載の水酸化されたカロテノイドの製造法。

(9) 下記の化学構造式(I)で示される新規化合物2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン(2,2'-ジヒドロキシカンタキサンチン)。

【0015】

【化2】



(I)

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 遺伝子源の海洋細菌ブレバンディモナス属SD-212 株 (MBIC 03018)

目的とする遺伝子の供給源となった海洋細菌ブレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212 株 (SD212; MBIC 03018) は、火山列島の海水中より単離された α -プロテオバクテリアである。GC含量は67.1 (mol) %である。本海洋細菌が作るカロテノイドは、2-ヒ

ドロキシアスタキサンチン (2-hydroxyastaxanthin) や2-ヒドロキシアドニキサンチン (2-hydroxyadonixanthin) 等の2位 (2' 位) に水酸基が導入されたカロテノイドであることが (株) 海洋バイオテクノロジー研究所の横山らにより報告されている (非特許文献2 参照)。なお、本細菌は、MBIC 03018として (株) 海洋バイオテクノロジー研究所より公開・分譲されている。また、本細菌の16S rDNA配列とgyrB遺伝子配列はそれぞれ、アクセシション番号AB016849、AB014993としてGenBank/DDBJに登録されている。

【0017】

2. 海洋細菌ブレバンディモナス属SD-212 株におけるカロテノイド生合成経路の推定
海洋細菌ブレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212 株 (MBIC 03018) が生産する、2位 (2' 位) に水酸基が導入されたカロテノイドは、横山らによって詳しく分析されている (非特許文献2 参照)。それらは、2,3,2',3' -テトラヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4' -ジオン (2,3,2',3' -tetrahydroxy- β , β -carotene-4,4' -dione) 、2,3,2',3' -テトラヒドロキシ- β , β -カロテン-4-オン (2,3,2',3' -tetrahydroxy- β , β -carotene-4-one) 、2-ヒドロキシアスタキサンチン (2-hydroxyastaxanthin; 2,3,3' -trihydroxy- β , β -carotene-4,4' -dione) 、2-ヒドロキシアドニキサンチン (2-hydroxyadonixanthin; 2,3,3' -trihydroxy- β , β -carotene-4-one) 、エリスロキサンチン (erythroxanthin; 3,2',3' -trihydroxy- β , β -carotene-4-one) である (図2参照)。また、SD-212 株には、前駆体として、アスタキサンチンやアドニキサンチン (4-ケトゼアキサンチン) が存在することも確認されている。 β -イオノン環の2位に水酸基を導入する新規な酵素 (β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ; CrtVと記載) の存在を想定すると、これ以外はすべて既存のCrt酵素との組合せにより、上記のすべてのカロテノイドの生合成経路を図2のように推定することができる。

【0018】

3. β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子 (本発明の遺伝子)

本発明には、以下の (a) 、(b) 、又は (c) に示すペプチドが含まれる。

(a) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

(c) 配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

【0019】

また、本発明には、以下の (a) 、(b) 、又は (c) に示すペプチドをコードする遺伝子も含まれる。

(a) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、

(c) 配列番号3記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

【0020】

(a) のペプチドは、ブレバンディモナス属SD-212株から得られた β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有する257個のアミノ酸配列からなるペプチド (CrtVとも呼ぶ) である。

【0021】

(b) のペプチドは、(a) のペプチドに、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を失わせない程度の変異が導入されたペプチドである。このような変異は、自然界において

生じる変異のほかに、人為的な変異をも含む。人為的変異を生じさせる手段としては、部位特異的変異誘発法 (Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982)などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を失わせない限り、その個数は制限されないが、通常は、30アミノ酸以内であり、好ましくは20アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好ましくは5アミノ酸以内である。

【0022】

(c) のペプチドは、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる細菌由来の β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチドである。(c) のペプチドにおける「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1×SSC、0.1%SDS、37°C」程度であり、好ましくは「0.5×SSC、0.1%SDS、42°C」程度であり、更に好ましくは「0.2×SSC、0.1%SDS、65°C」程度である。ハイブリダイゼーションにより得られるDNAは、配列番号3記載の塩基配列により表されるDNAと通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性、更に好ましくは90%以上の相同性を指す。

【0023】

本発明の遺伝子は、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、海洋細菌プレパンディモナス属SD-212株のコスミドライブラリーを大腸菌において作製する。次に、実施例7に示したようなカロテノイド生合成遺伝子の相同配列を利用したコロニーハイブリダイゼーション法やPCRクローニング法により得ることができる。

【0024】

なお、本発明の遺伝子である β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ (*crtV*) 遺伝子を含むプレパンディモナス属SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群を含む12 kb *Eco*RI DNA断片が大腸菌ベクターpBluescript II KS-に挿入されたプラスミドp5Bre2-15を有する大腸菌は受託番号P-19580として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0025】

4. β イオノン環の2位(2'位)の炭素に水酸基を導入できる微生物

本発明には、3に記載の β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ遺伝子を導入して得られる微生物であって、 β -イオノン環の2位の炭素に水酸基を導入できる微生物も含まれる。

【0026】

微生物には、本発明の遺伝子だけでなく、他のカロテノイド生合成遺伝子も導入する場合が多いが、微生物がもともと他のカロテノイド生合成遺伝子を含むものである場合には、他のカロテノイド生合成遺伝子を導入する必要はないか、或いは一部のみ導入すればよい。

【0027】

宿主とする微生物は、大腸菌を例示できるが、これ以外の微生物であってもよい。

【0028】

他のカロテノイド生合成遺伝子は、ファルネシルピロリン酸 (FPP) から β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部または一部を含む。このような遺伝子群の具体例としては、FPPからゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成する酵素遺伝子 *crtE*、2分子のGGPPからフィトエン (phytoene) を合成する遺伝子 *crtB*、フィトエンからリコ펜 (lycopene) を合成する遺伝子 *crtI*、リコ펜から β -カロテン (β -carotene) を合成する遺伝子 *crtY* (通常、エルウェニア属細菌由来のもの)、 β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子 *crtZ* (通常、エルウェニア属細菌またはパラコッカス属細菌由来のもの)、 β -イオノン環-4-ケトラーゼをコードする遺伝子 *crtW* (通常、パラコッカス属細菌由来のもの) 等を例示できる。

【0029】

これらの遺伝子群のすべて又は一部を適当な発現ベクターに導入し、発現させたい微生物

物に導入すれば、その組換え微生物は β -イオノン環を有するカロテノイドを作るようになる（基質のFPPはすべての微生物が作ることができる。GGPPも微生物によっては合成量が少ないものもあるが、すべての微生物が作ることができる）。その β -イオノン環を有するカロテノイド産生微生物に、本発明の遺伝子（ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子、crtV）をさらに導入・発現させれば、その微生物は2位（2'位）に水酸基が導入されたカロテノイドを作るようになる。

【0030】

大腸菌や酵母等の種々の微生物のベクターの情報や外来遺伝子の導入・発現法は、多くの実験書に記載されている（たとえば、Sambrook, J., Russel, D. W., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition, CSHL Press, 2001）、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入、発現を行うことができる。

【0031】

5. 2位（2'位）に水酸基が導入されたカロテノイドの製造法

本発明には、上記に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体から β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドを得ることを特徴とする、水酸化されたカロテノイドの製造法も含まれる。

【0032】

β -イオノン環の2位の炭素が水酸化されたカロテノイドとしては、 β, β -カロテン-2-オール（2-ヒドロキシ- β -カロテン）、 β, β -カロテン-2, 2' -ジオール（2, 2' -ジヒドロキシ- β -カロテン）、カロキサンチン（2-ヒドロキシゼアキサンチン）、ノストキサンチン（2, 2' -ジヒドロキシゼアキサンチン）、2-ヒドロキシ- β, β -カロテン-4, 4' -ジオノン（2-ヒドロキシカンタキサンチン）、2, 2' -ジヒドロキシ- β, β -カロテン-4, 4' -ジオノン（2, 2' -ジヒドロキシカンタキサンチン）、2-ヒドロキシアスタキサンチン、2, 3, 2' , 3' -テトラヒドロキシ- β, β -カロテン-4, 4' -ジオノン（2, 2' -ジヒドロキシアスタキサンチン）などを例示できるが、これらに限定されるわけではない。

【0033】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を表す。

【0034】

配列番号1：プレバンティモナス属SD-212株のcrtI遺伝子の部分配列。

【0035】

配列番号2：EcoRIでpCos5-2から切り出された12 kbの断片の配列。

【0036】

配列番号3：上記EcoRI断片に含まれるORF11（ β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ遺伝子と推定される）の配列。

【0037】

配列番号4：ORF11がコードするアミノ酸配列。

【0038】

配列番号5：ORF1の增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号6：ORF1の增幅用のプライマー（リバース）

配列番号7：crtWの增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号8：crtWの增幅用のプライマー（リバース）

配列番号9：crtYの增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号10：crtYの增幅用のプライマー（リバース）

配列番号11：crtIの增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号12：crtIの增幅用のプライマー（リバース）

配列番号13：crtBの增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号14：crtBの增幅用のプライマー（リバース）

配列番号15：ORF6の增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号16：ORF6の增幅用のプライマー（リバース）

配列番号17：ORF7の增幅用のプライマー（フォワード）

配列番号18：ORF7の増幅用のプライマー（リバース）
 配列番号19：crtEの増幅用のプライマー（フォワード）
 配列番号20：crtEの増幅用のプライマー（リバース）
 配列番号21：idiの増幅用のプライマー（フォワード）
 配列番号22：idiの増幅用のプライマー（リバース）
 配列番号23：crtZの増幅用のプライマー（フォワード）
 配列番号24：crtZの増幅用のプライマー（リバース）
 配列番号25：ORF11の増幅用のプライマー（フォワード）
 配列番号26：ORF11の増幅用のプライマー（リバース）
 配列番号27：ORF12の増幅用のプライマー（フォワード）
 配列番号28：ORF12の増幅用のプライマー（リバース）

【発明の効果】

【0039】

β -イオノン環の2(2')位の炭素に水酸基が導入されたカロテノイドは、自然界に微量しか存在しないものが多いが、なかには未だ発見されていないものもある。本発明により、このようなカロテノイドを大量に製造できるようになる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

以下、実施例により本発明について具体的に説明する。もっとも、本発明はこれにより限定されるものではない。

【実施例】

【0041】

【実施例1】 菌株、プラスミド、生育条件

本発明に用いられた菌株とプラスミドを表1に示す。菌株の培養は30°CでLB (Luria-Bertani) 培地または、2×YT培地 (Sambrook et al., 1989) を用いて行った。必要に応じて、アンピシリン (ampicillin; Ap, 100 μ g/ml) または、クロラムフェニコール (chloramphenicol; Cm, 20 μ g/ml) を培地に添加した。

【0042】

カンタキサンチン産生用プラスミドpAC-Cantha、及びアスタキサンチン、アドニキサンチン (4-ケトゼアキサンチン) 産生用プラスミドpAC-Astaは以下のようにして作製した。

【0043】

パラコッカス属MBIC 01143 (Agrobacterium aurantiacum) 由来のcrtW 遺伝子を、酵母キヤンディダ・ユーティリス (Candida utilis) のGAP遺伝子のコドン使用に合わせて全合成した。コードされるアミノ酸配列は元のCrtWと同じにしてある。この作製法は文献 (Miura et al., 1998) に示されている。この全合成されたcrtW配列を鋳型にして、H1437 [AvaI部位 (下線)、SD配列 (H1437の10-15番目の配列) を含む] とH1438 [NotI部位 (下線) を含む] プライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をAvaIとNotIで切断して、0.76 kb AvaI-crtW-NotI断片を得た。

H1437 : 5'-GTCCCGAGAAGGAGGCTAGATATGTCCGCTCACGCTTGC-3'

H1438 : 5'-CGGGCGCCGCCGGGACTAACGGGTGTACCCCTGGTCT-3'

プラスミドpCAR16 (Misawa et al., 1990) を鋳型にして、H1431 [NotI部位 (下線)、SD配列 (H1431の16-21番目の配列) を含む] とH1432 [SalI部位 (下線) を含む] プライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をNotIとSalIで切断して、1.1 kb NotI-crtE-SalI断片を得た。

H1431 : 5'-ATGCGGCCGCTTATAAGGACAGCCCCGAATG-3'

H1432 : 5'-CAGTCGACATCCTTAACTGACGGCAGCGAG-3'

【0044】

上記の0.76 kb AvaI-crtW-NotI断片と1.1 kb NotI-crtE-SalI断片をNotI部位を介して転結し、pACCAR16 Δ crtXをAvaI/SalI消化して得られた、crtY、crtI、crtBを有する大断片と連結することにより、プラスミドpAC-Canthaを得た。

【0045】

さらに、同様に上記の0.76 kb AvaI-crtW-NotI断片と1.1 kb NotI-crtE-SalI断片をNotI部位を介して転結し、pACCAR25△crtXをAvaI/SalI消化して得られた、crtY、crtI、crtB、crtZを有する大断片と連結することにより、プラスミドpAC-Astaを得た。

【0046】

【表1】

本発明に用いた菌株とプラスミド

| 菌株/プラスミド | 性質* | 文献/発売元 |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| 菌株 | | |
| <u>Brevundimonas</u> sp. MBIC03018 | 2-水酸化カロテノイドの生産細菌(SD-212 株) | Yokoyama et al, 1996 |
| <u>Escherichia coli</u> XL1-Blue MR | コスミドベクター, SuperCos1宿主 | Stratagene |
| <u>E. coli</u> DH5 α | 遺伝子操作実験用宿主 | TOYOB |
| プラスミド | | |
| pACCAR16△ <u>crtX</u> | Cm ^r , <u>crtE</u> , <u>crtB</u> , <u>crtI</u> , <u>crtY</u> を含むプラスミド | Misawa et al, 1995 |
| pACCAR25△ <u>crtX</u> | Cm ^r , <u>crtE</u> , <u>crtB</u> , <u>crtI</u> , <u>crtY</u> , <u>crtZ</u> を含むプラスミド | Misawa et al, 1995 |
| pAC-Cantha | Cm ^r , <u>crtE</u> , <u>crtB</u> , <u>crtI</u> , <u>crtY</u> , <u>crtW</u> を含むプラスミド | 本発明 |
| pAC-Asta | Cm ^r , <u>crtE</u> , <u>crtB</u> , <u>crtI</u> , <u>crtY</u> , <u>crtZ</u> , <u>crtW</u> を含むプラスミド | 本発明 |
| SuperCos 1 | Ap ^r , コスミドベクター | Stratagene |
| pBluescript II KS- | Ap ^r , クローニングベクター | TOYOB |
| pGEM-T Easy | Ap ^r , クローニングベクター | Promega |
| pUC18 | Ap ^r , クローニングベクター | TOYOB |
| pCos5-2 | Ap ^r , <u>Brevundimonas</u> sp. MBIC03018 株由来の 47 kb の DNA 断片(<u>Sau3AI</u> で部分的に消化されたものが SuperCos 1 の <u>BamHI</u> 部位に挿入されたもの) | 本発明 |
| pCRTI-SD212 | Ap ^r , <u>Brevundimonas</u> sp. MBIC03018 株由来 <u>crtI</u> が PCR で増幅され pGEM-T Easy に挿入されたもの | 本発明 |
| p5Bre2-15 | Ap ^r , pCos5-2 由来の 12 kb の <u>EcoRI</u> 断片が pBluescript II KS-に挿入されたもの | 本発明 |
| pUCBre-O11 | Ap ^r , p5Bre2-15 由来の 2-水酸化酵素遺伝子が PCR で増幅され、pUC18 に挿入されたもの | 本発明 |

* Ap^r, ampicillin 耐性, Cm^r, chloramphenicol 耐性

Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P. D., Misawa, Production of the carotenoids lycopene, β -carotene, and astaxanthin in the food yeast Candida utilis. N., Appl. Environ. Microbiol., 64, 1226-1229, 1998

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K., Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by the functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli. J. Bacteriol., 172, 6704-6712, 1990

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Yokoyama, A., Miki, W., Izumida, H., Shizuri, Y. 1996. New Trihydroxy-keto- carotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 200-203, 1996 (非特許文献2)

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed a

t the gene level. J. Bacteriol. 177, 6575-6585, 1995 (非特許文献1)

【0047】

〔実施例2〕 遺伝子操作実験

プラスミドの調製、制限酵素処理、ライゲーション反応、形質転換などの通常の遺伝子操作実験は、前述のSambrookら (1989) のMolecular Cloning (前述の文献) に示された方法により行った。

【0048】

〔実施例3〕 プレバンディモナス属SD-212株からの染色体DNAの調製

プレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212 株 (SD212 ; MBIC 03018) を 300 m¹のMarine Broth (MB) 培地 (Difco) で 25°C、3日間培養した。菌体を集菌後、STE緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM Tris・HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で二回洗浄し、68°Cで15分間熱処理をした後、5 mg/ml のリゾチーム (Sigma) と 100 μg/ml のRNase A (Sigma) を含むI液 (50 mM グルコース、25 mM Tris・HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した。37°Cで一時間インキュベートした後、250 μg/ml になるようにProtenase K (Sigma) を加え、37°Cで10分間インキュベートした。さらに最終濃度が1% になるようにN-Lauroylsarcosin・Naを添加し、転倒混和により穏やかに完全に混合した後37°Cで3時間インキュベートした。さらにフェノール/クロロホルム抽出を数回行った後、2倍量のエタノールをゆっくりと添加しながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒で巻きつけ、70% エタノールでリンスした後、2 mlのTE緩衝液 (10 mM Tris・HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解して、染色体DNA溶液とした。

【0049】

〔実施例4〕 PCR法によるフィトエンデサチュラーゼ遺伝子(*crtI*)の部分断片の増幅

カロテノイド産生細菌間のフィトエンデサチュラーゼ (phytoene desaturase ; フィトエン脱水素酵素) 遺伝子(*crtI*)の相同性を利用して得られた*crtI*-Foプライマー (5' -TTY GAY GCI GGI CCI ACI GT -3')、*crtI*-Reプライマー (5' -CCI GGR TGI GTI CCI GCI C C-3') を合成し、前出した方法により得られた、プレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを錆型として用い、PCR法により増幅した。耐熱性DNAポリメラーゼはLa-Taq (TaKaRa a) を用い、96°Cで5分間熱変性後、98°Cで20秒、58°Cで30秒、72°Cで1分の条件で35サイクルの増幅を行った。増幅産物は、1% アガロースゲル電気泳動で確認後、1.1 kbの長さのDNAをアガロースゲルから切り出し、精製 (Qiagene Gel Extraction kit、QIAGENE、もしくはGene Clean II Kit、BI0101) を行った。精製されたDNA断片は、pGEM-T Easyに連結し、大腸菌 (DH5 α) を形質転換した。このプラスミドをpCRTI-SD212と名づけ、アンピシリンを添加した2 mlのLB液体培地で37°C、一晩培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドは Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer) と model 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer) を用い付属のプロトコールに従って塩基配列 (部分配列) の決定を行った。決定されたDNA配列 (配列番号1) はBlast (Altschul and Lipman, 1990) を用いホモロジー検索を行いフィトエンデサチュラーゼ (phytoene desaturase) 遺伝子(*crtI*)とホモロジーを持つDNA断片であることを確認した。また、PCR後、精製されたDNA断片の一部は実施例7、8に示すコロニーハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーションのプローブとして用いた。

Altschul, S. F. and Lipman, D. J., Protein database search for multiple alignments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5509-5513, 1990.

【0050】

〔実施例5〕 コスミドライブラーの作製

プレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAの調製液からファージ粒子を得るところまでの実験方法はStratagene社のSuperCos 1 Cosmid Vector Kitの取扱説明書に従って行った。すなわちプレバンディモナス属SD-212株から得られた染色体DNAをSau3AIで部分消化を行いコスミドベクターのBamHI部位に連結し、LAMBDA INN (Nippon Gene) を用いてファージ粒子にパッケージングした。そして、大腸菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue MR株、及び、プラスミドpACCAR25ΔcrtXを含み ゼアキサンチンを作る大腸菌XL1-Blue MR株に、

そのファージを感染させ、抗生物質Ap耐性、及びAp、Cm耐性のコロニーを、Ap、及びAp、Cmを含むLBプレート上に各々、約1,000個ずつ得た。得られたコロニーは滅菌した楊枝を用いて、新たに抗生物質を含むLBプレート上に植え継いだ。なお、この段階で色の変化したコロニーは全く得られなかった。

【0051】

このコスミドベクターSuperCos 1 (Stratagene) は7.9 kbのベクターで30~45 kbのDNA断片を挿入することができる。また、cos領域が二つあるので、パッケージングの効率がよく、コスミドコンカテマーのパッケージングを防ぐための脱リン酸化操作が不要であり、挿入したい染色体DNAの方を脱リン酸化できるために、染色体DNA断片の再結合断片の混入の心配が無く、サイズ分画も不要であるという利点がある。

【0052】

【実施例6】 発現クローニングの試み

実施例5で作製したプラスミドpACCAR25△crtXを含み ゼアキサンチンを作る大腸菌を宿主として作製したコスミドライブラーー700コロニーを用いて、各々2 mlずつ培養し、アセトンでカロテノイド色素を抽出した後、HPLC-PDA (フォトダイオードアレイ検出器) 分析により、カロテノイドの分析を行った。方法は、実施例11に示されている。コントロールのゼアキサンチンに加えて、新たなカロテノイドが生成していないかどうかの検討を行った。その結果、新たなカロテノイドを合成するものは全く得られなかった。したがって、プレバンディモナス属SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子の発現クローニングは不可能であると結論した。

【0053】

【実施例7】 コロニーハイブリダイゼーション

実施例5で作製した大腸菌XL1-Blue MRを宿主として作製したコスミドライブラーー500コロニーを用いて、実施例4で示したPCR法により増幅したフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 (crtI) の部分断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション (colony hybridization) 法を行い、crtI遺伝子を含むクローニングのスクリーニングを行った。まず、大腸菌をプレートに植え37℃で培養した。このとき、大腸菌は一枚のプレートあたり、48コロニーずつ植え付けた。一晩培養後、直径82 mmのHybond-N+メンブレン (Amersham Pharmacia) をプレートに乗せ、注射針で目印をつけた。メンブレンをはがし、菌体が付着した面を上に向け、10% SDS溶液を含んだ3 mmろ紙 (Whatman) で5分間インキュベート後、さらに変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) を含んだ3 mmろ紙で5分間インキュベートを行い、その後メンブレンを中和液 (1.5 M NaCl, 0.5M Tris・HCl) に5分間つけた (2回)。さらに2×SSCで2回洗浄した。このとき、細胞の破片を残さないようにキムタオルでメンブレンを強くこすった。処理後、メンブレンは、キムタオル、キムワイプ上で30分間風乾後、80℃で2時間ベーキング (baking) を行い、メンブレンにDNAを固定した。プローブDNAは、Alkphos Direct Labeling and Detection System (Amersham Pharmacia) を用い、添付のプロトコールに従って作製し、コロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、500株のクローニングから、フィトエンデサチュラーゼ遺伝子 (crtI) の部分断片をプローブDNAとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法により6個のポジティブクローニングが得られた。6個のポジティブクローニングに存在するプラスミドを、pCos5-1、pCos5-2、pCos7-1、pCos8-1、pCos9-1、pCos10-1と名づけた。

【0054】

【実施例8】 サザンハイブリダイゼーション

実施例7で選抜された、6つのポジティブクローニングを、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晩培養した後、プラスミドDNAを抽出した。抽出後のプラスミドDNAは、EcoRIで37℃、数時間インキュベートし、完全消化した後、電気泳動を行った。コントロールとして、ベクターのSuperCos 1、プレバンディモナス属SD-212の染色体DNAを同様に消化したものを用いた。電気泳動には、小型のサブマリン型の電気泳動槽Mupid (コスモバイオ) を用い1%アガロースゲルを用いて50 Vで約70分電気泳動を行った。なお、電気泳動バッファーには1×TBEバッファーを用いた。ゲルは電気泳動後、エチジウムプロマイドで染色し

、超純水で脱色後、UV照射下で写真撮影をした（図3）。その後0.4M NaOH溶液を用いてキヤピラリープロッティングを行うことによりナイロンメンブレン（Hybond N+）にトランスファーした。処理後、メンブレンを80℃で2時間、ベーキング（baking）を行い、メンブレンにDNAを固定した。その後、Alkphos Direct Labeling and Detection System (Amersham Pharmacia)を用い、添付のプロトコールに従って、サザンハイブリダイゼーションを行った。また、プローブDNAには、前述したフィトエンデサチュラーゼ遺伝子（crtI）の部分断片を用いた。その結果、6つのポジティブクローンのうちpCos5-2、pCos7-1、pCos9-1の3つのクローンにおいて、12 kbのEcoRI断片にポジティブシグナルが認められた（図3）。コントロールのSD-212染色体DNAは、電気泳動で確認したところ、高分子側でスミアなバンドが認められ、ほとんど消化されていなかった。僅かながらも、高分子側で陽性のシグナルが認められた。ほとんど消化されない原因としては、染色体DNAが部分的にメチル化されEcoRIによる分解が阻害されたことなどが考えられる。さらに、3つのポジティブクローンのプラスミドとSuperCos 1、ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAをBamHIもしくはBamHI-EcoRIで消化し、同様の実験を行った（図4）。その結果BamHIによる消化を行ったものでは、9 kbのDNA断片にポジティブシグナルが認められ、BamHI-EcoRIによる消化を行ったものでは、8.2 kbのポジティブシグナルが認められた。ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAの消化物にも、同様のサイズのバンドでポジティブシグナルが薄いながらも認められた。

【0055】

【実施例9】 カロテノイド遺伝子クラスターの解析

実施例8で選抜された3つの陽性クローン（pCos5-2、pCos7-1、pCos9-1）のうちpCos5-2を用い、12 kbの挿入断片をEcoRIで切り出し、プラスミドベクターpBluescript II KS-のEcoRI部位に連結し、大腸菌（*E. coli*）DH5 α 株を形質転換した。このプラスミドをp5Bre2-15と名づけた。この大腸菌を、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晩培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の決定を行った。決定されたDNA配列（配列番号2）はGeneMark.hmm (Lukashin A. and Borodovsky M.) 用い遺伝子コード領域を推定し、SD様配列の確認などを行い、12 kbの断片中に12個のORF (open reading frame) を発見した（図5）。Blast を用い、各ORFのアミノ酸配列レベルでのホモロジー検索を行い、12個のうち7個は、既知のカロテノイド生合成遺伝子（crtW, crtY, crtI, crtB, crtE, crtZ, idi）と相同性を示すことがわかった（表2）。残りの5個の遺伝子は、既存のどんな遺伝子とも全体的な相当性は有さない未知遺伝子であった。また、各crt遺伝子の配置を調べてみると、crtW、crtZ遺伝子の位置やその他の遺伝子の向きなど、かつて報告された水酸基を β -イオノン（ β -ionone）環に有するカロテノイド類を生産する細菌のカロテノイド生合成遺伝子群（Misawa et al., 1990 & 1995; Hannibal et al., 2000）と大きく異なる構造を有することがわかった（図5）。IPPイソメラーゼ遺伝子（idi）が、カロテノイド生合成遺伝子群内に存在するというのも初めてである。なお、上記の12個のORF（7個のcrt遺伝子を含む）すべてを含むプラスミドp5Bre2-15を有する大腸菌は、カロテノイドを全く生産できなかった。したがって、ブレバンディモナス属（*Brevundimonas* sp.）SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群は、このままの状態では大腸菌で機能発現しないことが明らかとなった。

【0056】

【表2】

Brevundimonas 属 SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群に存在する各種ORFの特徴と機能の推定

| ORF名 | GC% | アミノ酸残基数 | 予想される機能 | その他生物の遺伝子産物との相同意 (%) | GenBank number |
|-------------|------|---------|---------------------------|---|----------------|
| ORF1 | 69.7 | 140 | 未知 | | |
| <i>crtW</i> | 69.6 | 244 | β -カロテン C4オキシケナーゼ | CrtW: <i>Brevundimonas aurantiaca</i> (96) | AAN86030 |
| <i>crtY</i> | 70.2 | 392 | リコベンシクラーゼ | CrtY: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (53) | AF408848 |
| <i>crtI</i> | 67.3 | 489 | フイトエンテサチュラーゼ | Crt I: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (72) | AF408848 |
| <i>crtB</i> | 72 | 310 | フイトエンシンターゼ | CrtB: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (54) | AF408848 |
| ORF6 | 75.8 | 355 | 未知 | | |
| ORF7 | 74.6 | 315 | 未知 | | |
| <i>crtE</i> | 71 | 298 | GGPP シンターゼ | CrtE: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (42) | AF408847 |
| <i>idi</i> | 74.9 | 350 | Type II IPP イソメラーゼ | IPP イソメラーゼ: <i>Pantoea agglomerans</i> Eho10 (55) | Q01335 |
| <i>crtZ</i> | 66.9 | 161 | β -カロテン C3 ヒドロキシラーゼ | CrtZ: <i>Alcaligenes</i> sp. PC1 (49) | Q44262 |
| ORF11 | 70.7 | 257 | 未知 | | |
| ORF12 | 66.7 | 122 | 未知 | | |

CrtW, *Brevundimonas aurantiaca* (GenBank number AAN86030); CrtY, CrtI, CrtB, CrtE, *Xanthobacter* sp. Py2 (GenBank no. AF408848, AF408847); IPP isomerase, *Pantoea agglomerans* Eho10 (*Erwinia herbicola*) (GenBank no. Q01335); CrtZ *Alcaligenes* sp. PC1 (GenBank no. Q44262)

Lukashin A. and Borodovsky M., 1998, GeneMark.hmm: new solutions for gene finding, NAR, Vol. 26, No. 4, pp. 1107-1115.

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. and Harashima, K., Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172, 6704-6712, 1990

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177, 6575-6585, 1995 (非特許文献1)

Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N.A., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Beroin, C., Dreyfus, B. and Giraud, E., Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. J. Bacteriol. 182, 3850-3853, 2000

Larsen, R.A., Wilson, M.M., Guss, A.M. and Metcalf, W.W., Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. Arch. Microbiol. 178, 193-201, 2002

【0057】

【実施例10】 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドの構築

各種ORFの機能を明らかにするため、大腸菌ベクターpUC18 (TOYOBO) のコードする β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) のリード配列との融合タンパク質となるように各ORFを、プラスミドp5Bre2-15のDNAを鋳型としてPCRで増幅し、 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用の各種プラスミドの構築を行った。この方法により大腸菌で機能発現されることを期待したからである。具体的には、各ORFを5'末端側にEcoRI部位を、3'末端側にBamHIもしくはXbaI部位を持つ増幅産物が得られるように設計した配列番号 (5~28) のプライマーを用いてPCRにて増幅した。耐熱性DNAポリメラーゼはLa-Taq (TaKaRa) を用い、各

々96℃で5分間熱変性後、98℃で20秒、56℃で30秒、72℃で1分の条件で35サイクルの增幅を行った。増幅産物の一部は、1%アガロースゲル電気泳動で確認した。残りの増幅産物はエタノール沈殿後、EcoRIによる消化と、BamHIもしくはXbaIによる消化を行い。1%アガロースゲル電気泳動を行った。次に目的の長さのDNAをアガロースゲルから切り出し、精製(Qiagene Gel Extraction kit、QIAGENE、もしくはGene Clean II Kit、BI0101)を行った。切り出されたDNAはpUC18のEcoRIと、BamHIもしくはXbaI部位に連結し、大腸菌DH5 α に形質転換した。この β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドでは、各ORFの本来の開始のアミノ酸配列Metの前に、 β -ガラクトシダーゼの7個のアミノ酸からなるリーダ配列MetThrMetIleThrAsnSerが付加されるようにデザインされている。

【0058】

〔実施例11〕 β -ガラクトシダーゼ-各種Crt融合タンパク質遺伝子の発現と色素生産の解析

実施例10で示したプラスミドのうち、crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ、crtW遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晩培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の確認を行った。各プラスミドの名前をそれぞれpUCBre-E (lacZ::crtE)、pUCBre-B (lacZ::crtB)、pUCBre-I (lacZ::crtI)、pUCBre-Y (lacZ::crtY)、pUCBre-Z (lacZ::crtZ)、pUCBre-W (lacZ::crtW)と名づけた。

その後、表3の左に示す各種カロテノイド生産性プラスミド (chloramphenicol、Cm耐性)を有する大腸菌にこれらのプラスミドを導入し、Ap、Cmを添加した2 mlのLB液体培地で1 mMのIPTG添加による誘導下で30℃、48培養後、遠心分離により集菌し、菌体をSTEで二回洗浄後、200 μ lのアセトンを添加し、ボルテックすることにより色素を菌体からアセトンへ移した。その後、遠心分離を行い、上清をろ過し、HPLC-PDAシステム (Waters Alliance 2695および2996フォトダイオードアレイ検出器)で色素の分析を行った。カラムにはTSK gel ODS-80Ts (TOSOH)を用い、送液条件は、A液 (95%メタノール)、B液 [メタノール: テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran; THF), 7 : 3] で5分間A液100%を送液し、5分から10分の間でA液 100 %からB液 100 %に直線グラジエントを行い、その後B液を8分間送液した。なお、検出はフォトダイオードアレイ検出器で行い、付属のEmpowerソフトウェアで解析を行った。標品としては、各種カロテノイド合成能を有する大腸菌 (表3左) から抽出した色素または合成品を標品として用い、470 nmでの保持時間と吸収波形の比較により予想通りの各種カロテノイドが生産されることを確認した (表3右)。これらの結果より、ブレバンディモナス属SD-212株の各種融合crt遺伝子が大腸菌内で機能し、既存のcrt遺伝子 (crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ、crtW) と同様の機能を有することが明らかとなった。ただし、pUCBre-I (lacZ::crtI) とpUCBre-Y (lacZ::crtY)の発現は、大腸菌ではかなり弱かった。

【0059】

【表3】

Brevundimonas 属 SD-212株の各種crt遺伝子の機能の同定

| 宿主として用いられた組換え大腸菌の性質 プラスミド | 蓄積されるカロテノイド FPP GGPP フィトエン リコペン β -カロテン カンタキサンチン β -カロテン | 二重組換え大腸菌が生産するカロテノイド色素の同定 プラスミド SD-212由来のcrt遺伝子 (lacZ :: 各種crt) | |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------------|
| | | 生産されたカロテノイド | |
| pACCAR25 Δ crtE(crtB,I,Y,Z,X) | FPP | pUCBre-E (lacZ :: crtE) | ゼアキサンチン, そのケルコシド |
| pACCAR25 Δ crtB(crtE,I,Y,Z,X) | GGPP | pUCBre-B (lacZ :: crtB) | ゼアキサンチン, そのケルコシド |
| pACCRT-EB(crtE,B) | フィトエン | pUCBre-I (lacZ :: crtI) | リコペン(微量) |
| pACCRT-EIB(crtE,B,I) | リコペン | pUCBre-Y (lacZ :: crtY) | γ -カロテン(微量) |
| pACCAR16 Δ crtX(crtE,B,I,Y) | β -カロテン | pUCBre-Z (lacZ :: crtZ) | ゼアキサンチン(80%), β -クリプトキサンチン(10%) |
| pAC-Cantha(crtE,B,I,Y,W) | カンタキサンチン | pUCBre-Z (lacZ :: crtZ) | アスタキサンチン(41%), アドニキサンチン(47%) |
| pACCAR16 Δ crtX(crtE,B,I,Y) | β -カロテン | pUCBre-W (lacZ :: crtW) | カンタキサンチン(90%), エキネノン(5%) |

【0060】

〔実施例12〕 β -ガラクトシダーゼ-ORF11融合タンパク質の発現と色素生産の解析
実施例10で示したプラスミドのうち、機能の推定ができないORF1, ORF6, ORF7, ORF11, ORF12を含むプラスミドを有する大腸菌を、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晩培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の確認を行った。各プラスミドの名前をそれぞれpUCBre-01 (lacZ::SD212-ORF1)、pUCBre-06 (lacZ::SD212-ORF6)、pUCBre-07 (lacZ::SD212-ORF7)、pUCBre-011 (lacZ::SD212-ORF11)、pUCBre-012 (lacZ::SD212-ORF12)と名づけた。その後、表3の左に示す各種カロテノイド生産性プラスミド (Cm耐性)を有する大腸菌にこれらのプラスミドを導入し、Ap、Cmを添加した2 mlのLB液体培地で1 mMのIPTG添加による誘導下で30℃、48培養後、遠心分離により集菌し、菌体をSTEで二回洗浄後、200 μ lのアセトンを添加し、ボルテックすることにより色素を菌体からアセトンへ移した。その後、遠心分離を行い、上清をろ過し、HPLC-PDAシステムにより、実施例11と同様方法により色素の分析を行った。

【0061】

上記の実験を行った結果として、プラスミドpUCBre-011を導入した大腸菌のみがポジティブな結果が得られた。すなわち、ORF11の融合発現用プラスミドpUCBre-011 (lacZ::SD212-ORF11)を、pACCAR16 Δ crtXを有する β -カロテン産生大腸菌 (DH5 α)に導入した株の色素抽出液では、保持時間16分のところに β -カロテン (451 nm, 478 nm)の存在が認められ、高極性側の11分のところに451.0 nm, 478.8 nmの吸収極大を持つ物質が認められ、さらに、13分のところに452.2 nm, 477.6 nmの吸収極大を持つ物質が認められた(図6、矢印で示されている)。ただし、変換産物の量は少なかった。これらはゼアキサンチンである可能性もあるため、pACCRT25 Δ crtX由来のゼアキサンチンを主成分とするアセトン抽出物と混合し、co-HPLCを行った。その結果、これら2つのピークはゼアキサンチン(抽出物と混合し、co-HPLCを行った。その結果、これら2つのピークはゼアキサンチン(保持時間: 10.6分)のピークとは重ならなかったので(図6c)、これらの2つの変換産物は

、ゼアキサンチンと異なる物質であることがわかった。保持時間11分と13分のカロテノイドは、それぞれ、 β, β -カロテン-2,2'-ジオール (β, β -carotene-2,2'-diol; 2,2'-ジヒドロキシ- β -カロテン) 、及び、 β, β -カロテン-2-オール (β, β -caroten-2-ol; 2-ヒドロキシ- β -カロテン) であると考察された(図10参照)。

【0062】

ORF11の融合発現用プラスミドpUCBre-011 (lacZ::SD212-ORF11) を、pACCAR25ΔcrtXを有するゼアキサンチン産生大腸菌 (DH5 α) に導入した株の色素抽出液では、10.6分の保持時間にゼアキサンチン (451 nm、480 nm) の存在が認められ、それ以外に新たなピークとして、9.1分のところに451.0 nm、478.8 nmの吸収極大を持つ物質1が認められ、また、9.9分に452.2 nm、477.6 nmの吸収を持つ物質2のピークが観察された(図7、矢印で示されている)。カロテノイド1及び2はそれぞれ、ノストキサンチン (2,2'-ジヒドロキシゼアキサンチン) 、及び、カロキサンチン (2-ヒドロキシゼアキサンチン) であると同定された(図10、実施例13参照)。以上の結果は、ORF11がコードする遺伝子産物は β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ (β -C2-hydroxylase) であり、 β -カロテンやゼアキサンチンにおける β -イオノン環上の2位の炭素に水酸基を導入できる酵素であることを示している。

【0063】

次に、 β -イオノン環の4位にケト基を導入する酵素遺伝子を保持するプラスミドpAC-Ca^{ntha}を有するカンタキサンチン産生大腸菌 (DH5 α) にプラスミドpUCBre-011 (lacZ::SD212-ORF11) を導入し、実施例11で示した方法で色素分析を行った。その結果、保持時間10.7分にカンタキサンチンのピークが認められ、高極性側に保持時間4.7分の物質3、保持時間8.7分の物質4の2つのピークが認められた(図8、矢印で示されている)。それぞれの極大吸収波長はそれぞれ、478 nm、474 nmであり、それらの波形は β -イオノン環の共役系にケト基を有するカロテノイドに見られる典型的な一山形の波形を示す物質の存在が示された。また、アスタキサンチン(保持時間6.6分前後)とのco-HPLCの結果によりこれのピークはアスタキサンチンでないことが確認された(図8c)。カロテノイド3及び4はそれぞれ、2,2'-ジヒドロキシ- β, β -カロテン-4,4'-ジオン (2,2'-ジヒドロキシカンタキサンチン) 、及び、2-ヒドロキシ- β, β -カロテン-4,4'-ジオン (2-ヒドロキシカンタキサンチン) であると同定された(図10、実施例13参照)。

【0064】

最後に、プラスミドpAC-Astaを有するアスタキサンチンやアドニキサンチン産生大腸菌 (DH5 α) にプラスミドpUCBre-011 (lacZ::SD212-ORF11) を導入し、実施例11で示した方法で色素分析を行った(図9)。その結果、保持時間6.4~6.7分にアスタキサンチンのピークがまた、保持時間8.4~8.6分のところにアドニキサンチンのピークが観察された。また、保持時間5.1~5.2分のアスタキサンチンより高極性側に475 nmの吸収極大を示す、 β -イオノン環の共役系にケト基を有するカロテノイドに見られる典型的な一山形の波形を示す物質5の存在が示された(図9、矢印で示されている)。カロテノイド5は、2-ヒドロキシアスタキサンチンであると同定された(図2、実施例13参照)。また、以上の結果より、ORF11のコードする遺伝子産物 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼは、他のカロテノイド生合成酵素のように基質特異性が低い(広い)ことが明らかとなった。

【0065】

[実施例13] ORF11による変換された色素の同定(既知物質)

pUCBre-011及びpACCAR25ΔcrtXを導入した大腸菌を2 L(リットル)の2xYT培地で培養し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、菌体を集めた。菌体をSTE緩衝液(実施例3参照)で懸濁し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、再度、菌体を集めた。菌体にアセトン-メタノール(1:1)400 mlを加えて1時間攪拌した。濾過後、濾液を減圧濃縮し、267 mgの抽出物を得た。これをシリカゲル-60(15 g)カラムクロマトグラフィーで分離した。溶媒はヘキサン-酢酸エチル(8:2) (7:3) (6:4) および(1:1)各100 mlで順次溶出し、着色した3フラクションを得た。1つはゼアキサンチンであったので、残りの2フラクションの同定を行った。同定はHPLC-PDA-MS分析、¹H-NMR分析により行った

。HPLC-PDA-MS分析は、PDA（フォトダイオードアレイ）検出器付きセミミクロHPLCシステムとして資生堂製Nano Space SI-2を用い、これにサーモクエスト（ThermoQuest）社製イオントラップ型質量分析装置LCQ advantageシステムを接続した機器を用いて行った。カラムはC30カラムである野村化学社製Deverosil C30-UG-3 (1.0 mm i. d. × 150 mm) を用い、プレカラムとしてDeverosil C30-UG-Sを用いた。溶出条件として、0.1 ml/min の流速で、96%メタノール（A）で12分、Aからtert-メチルブチルエーテル（TMBE）（B）へのグラジエント（B: 0-60%、12~72分）、そのままの状態で72~82分溶出した。MSは大気圧化学イオン化法（APCI）により検出した。¹H-NMRはバリアン社製INOVA750システムを用いて重クロロホルム中で測定した。

【0066】

HPLC-PDA-MS分析（保持時間（RT）13.48分、 λ_{max} 449, 475 nm、m/z 601 [M+H]⁺、583 [M+H-H₂O]⁺、565 [M+H-2H₂O]⁺、及び、RT 17.75分、 λ_{max} 450, 476 nm、m/z 585 [M+H]⁺、567 [M+H-H₂O]⁺）、¹H-NMR分析の結果、上記の2つのフラクションに存在するカロテノイドはそれぞれ、ノストキサンチン（nostoxanthin; 2, 2'-ジヒドロキシゼアキサンチン）、及び、カロキサンチン（caloxanthin; 2-ヒドロキシゼアキサンチン）であると同定された（Bucheker, R., Liaaen-Jensen, S., Borch, G., Siegelman, H. W., Carotenoids of blue-green algae. Part 9. Carotenoids of *Anacystis nidulans*, structures of caloxanthin and nostoxanthin. Phytochemistry 15, 1015-1018, 1976）（図10参照）

◦

【0067】

以下に、¹H-NMRデータ（δ ppm、かっこ内は水素数、多重度、結合定数）を示す。ノストキサンチン：1.01(6H, s), 1.14(6H, s), 1.72(6H, s), 1.98-1.99(12H, s), 2.15(2H, dd, J=17.4, 10.0Hz), 2.49(2H, dd, J=17.4, 6.7Hz), 3.33(2H, d, J=10.0Hz), 3.84(2H, dt, J=6.7, 10.0Hz), 6.0-6.7(14H, m)、カロキサンチン：1.01(3H, s), 1.08(6H, s), 1.14(3H, s), 1.49(1H, t, J=12.0Hz), 1.72(3H, s), 1.75(3H, s), 1.80(1H, m), 1.98-1.99(12H, s), 2.05(1H, dd, J=17.4, 10.5Hz), 2.15(1H, dd, J=17.4, 10.0Hz), 2.40(1H, dd, J=17.4, 6.3 Hz), 2.49(1H, dd, J=17.4, 6.7Hz), 3.33(1H, d, J=10.0 Hz), 3.84(1H, dt, J=6.7, 10.0 Hz), 4.01(1H, m), 6.0-6.7(14H, m)。

【0068】

pUCBre-011及びpAC-Astaを導入した大腸菌を2 Lの2xYT培地で培養し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、菌体を集めた。菌体をSTE緩衝液（実施例3参照）で懸濁し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、再度、菌体を集めた。菌体にアセトン-メタノール（1:1）400 mlを加えて1時間攪拌した。濾過後、濾液を減圧濃縮し、27 mgの抽出物を得た。これをシリカゲル-60（15 g）カラムクロマトグラフィーで分離。溶媒はヘキサン-酢酸エチル（7:3）（6:4）および（1:1）各100 mlで順次溶出し、着色した3フラクションを得た。2つはアスタキサンチン及びアドニキサンチンであったので、残り1フラクションを得た。2つはアスタキサンチン及びアドニキサンチンであったので、残り1フラクションの同定を行った。HPLC-PDA-MS分析（RT 11.98 分、 λ_{max} 473 nm、m/z 613 [M+H]⁺）、¹H-NMR分析により、これは、2-ヒドロキシアスタキサンチン（2-hydroxyastaxanthin）であると同定された（非特許文献2）（図2参照）。以下に¹H-NMRデータを示す。1.22(3H, s), 1.27(3H, s), 1.30(3H, s), 1.33(3H, s), 1.82(1H, m), 1.96(6H, s), 1.98-2.01(12H, s), 2.17(1H, bm), 3.53(1H, m), 4.19(1H, m), 4.33(1H, m), 6.2-6.7(14H, m)。今回は2,3,2',3' -テトラヒドロキシ-β, β-カロテン-4,4' -ジオン（2,3,2',3' -m）。今回は2,3,2',3' -テトラヒドロキシ-β, β-カロテン-4,4' -dione; 2,2' -ジヒドロキシアスタキサンチン）のtetrahydroxy-β, β-carotene-4,4' -dione; 2,2' -ジヒドロキシアスタキサンチン）の確認には至らなかったが、培養条件の工夫等により、これを得ることも可能であるはずである。

【0069】

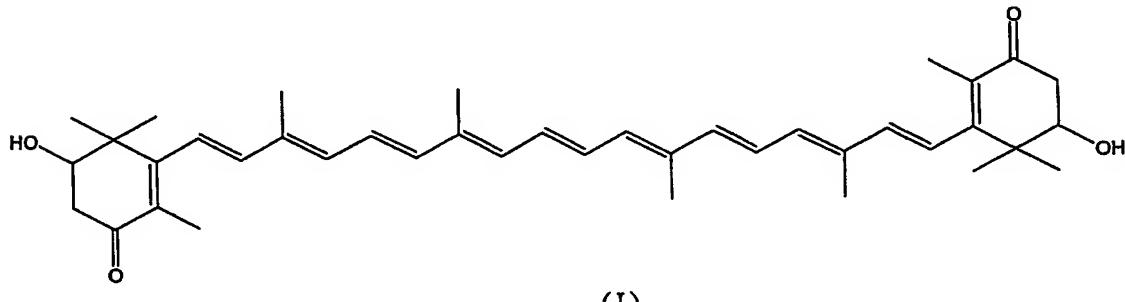
〔実施例14〕ORF11による変換された色素の同定（新規物質）

pUCBre-011及びpAC-Canthaを導入した大腸菌を2リットルの2xYT培地で培養し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、菌体を集めた。菌体をSTE緩衝液（実施例3参照）で懸濁

し、8,000 rpmで10分間遠心することにより、再度、菌体を集めた。菌体にアセトン-メタノール(1:1)400 mlを加えて1時間攪拌した。濾過後、濾液を減圧濃縮し、85 mgの抽出物を得た。これをシリカゲル-60(15 g)カラムクロマトグラフィーで分離した。溶媒はヘキサン-酢酸エチル(8:2) (7:3) および(1:1)各100 mlで順次溶出し、着色した3フラクションを得た。1つはカンタキサンチンであったので、残りの2フラクションの同定を行った。HPLC-PDA-MS分析(RT 9.30分、 λ_{max} 472 nm、m/z 597.2 [M+H]⁺、及び、RT 17.62分、 λ_{max} 474 nm、m/z 581.2 [M+H]⁺)、高分解(HR)FABMS分析、¹Hならびに各種二次元NMR分析により、これらは、2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオノール(2,2'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione; 2,2'-ジヒドロキシカンタキサンチン、新規化合物(I))、及び、2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン(2-hydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione; 2-ヒドロキシカンタキサンチン)であると同定された(図10参照)。

【0070】

【化3】



以下に、HRFABMS分析データと¹H-NMRデータを示す。2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン: HRFABMS(m/z, [M]⁺)、計算値 596.3866(C₄₀H₃₂O₄)、実測値 596.3863、¹H NMR(750MHz、重クロロホルム中、 δ ppm)、1.22(6H, s), 1.26(6H, s), 1.89(6H, s), 2.00-2.02(12H, s), 2.62(2H, dd, J=17.4, 9.0Hz), 2.80(2H, dd, J=17.4, 4.5Hz), 3.90(2H, dd, J=9.0, 4.5Hz), 6.2-6.7(14H, m)。2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン: HRFABMS(m/z, [M]⁺)、計算値 580.3916(C₄₀H₃₂O₃)、実測値 580.3900、¹H NMR、1.21(6H, s), 1.22(3H, s), 1.26(3H, s), 1.85(2H, t, J=7.0Hz), 1.89(3H, s), 1.90(3H, s), 2.00-2.02(12H, s), 2.51(2H, t), 2.62(1H, dd, J=17.4, 9.0Hz), 2.8(1H, dd, J=17.4, 4.5Hz), 3.90(1H, dd, J=9.0, 4.5Hz), 6.2-6.7(14H, m)。

【0071】

カンタキサンチンの2(2')位の両方の炭素に水酸基が導入された2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオンは上述のとおり自然界で未だ発見されていない新規化合物であるが、片方にのみ水酸基が導入された2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオンもある。片方にのみ水酸基が導入された2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオンも甲殻類の一種であるDaphnia magnaから単離されたという報告があるので、微生物により生産されたものはこれが初めてである(Partali, V., Olsen, Y., Foss, P., Liaaen-Jensen, L., Carotenoids in food chain studies-I. Zooplankton (Daphnia magna) response to a unicellular (Scenedesmus acutus) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids. Comp. Biochem. Physiol., 82B(4), 767-772, 1985; Foss, P., Partali, V., Olsen, Y., Borch, G., Liaaen-Jensen, S., Animal carotenoids 29. New (2R)-2-hydroxy-4-keto- β -type carotenoids from Daphnia magna (Crustaceae). Acta Chemica Scandinavica B40, 157-162, 1986)。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】既存のカロテノイド生合成遺伝子(酵素)の機能と生合成経路を表す図。

【図2】プレバンディモナス属SD-212株が生産するカロテノイドの種類とそれらのカロテノイドの推定合成経路を表す図。

【図3】crtI断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション (EcoRI消化) の結果を表す図。

【図4】crtI断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション (BamHI及びBamHI/EcoRI消化) の結果を表す図。

【図5】プレバンディモナス属SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群の構造を表す図。

【図6】pACCAR16 Δ crtX (β -カロテン生産用プラスミド) 導入大腸菌を宿主として利用したHPLC-PDA分析結果を表す図。a) pACCAR16 Δ crtX導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。b) pUCBre-011及びpACCAR16 Δ crtX導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。新規な色素のピークは矢印で示されている。c) b)にゼアキサンチンを添加したHPLCクロマトグラム (470 nm)。

【図7】pACCAR25 Δ crtX (ゼアキサンチン生産用プラスミド) 導入大腸菌を宿主として利用したHPLC-PDA分析結果を表す図。a) pACCAR25 Δ crtX導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。b) pUCBre-011及びpACCAR25 Δ crtX導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。新規な色素のピークは矢印で示されている。c) b)にゼアキサンチンを添加したHPLCクロマトグラム (470 nm)。1、2はそれぞれ、ノストキサンチン、カロキサンチンと同定された。

【図8】pAC-Cantha (カンタキサンチン生産用プラスミド) 導入大腸菌を宿主として利用したHPLC-PDA分析結果を表す図。a) pAC-Cantha導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。b) pUCBre-011及びpAC-Cantha導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。新規な色素のピークは矢印で示されている。c) b)にアスタキサンチンを添加したHPLCクロマトグラム (470 nm)。3、4はそれぞれ、2,2'-ジヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオン、及び、2-ヒドロキシ- β , β -カロテン-4,4'-ジオンであると同定された。

【図9】pAC-Asta (アスタキサンチン生産用プラスミド) 導入大腸菌を宿主として利用したHPLC-PDA分析結果を表す図。a) pAC-Asta導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。b) pUCBre-011及びpAC-Asta導入大腸菌の產生色素のHPLCクロマトグラム (470 nm)。新規な色素のピークは矢印で示されている。2は2,3,2',3'-テトラヒドロキシ- β , β -カロテン-4-オンと同定された。c) b)にアスタキサンチンを添加したHPLCクロマトグラム (470 nm)。5は2-ヒドロキシアスタキサンチンと同定された。

【図10】組換え大腸菌が生産するカロテノイドの種類とそれらのカロテノイドの推定合成経路を表す図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.

<120> A NOVEL CAROTENOID HYDROXYLASE GENE AND A METHOD FOR PRODUCING HYDROXY CAROTENOID

<130> P04-025

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 519

<212> DNA

<213> Brevundimonas sp.

<400> 1

ttcgatgcgg ggccgacggt catcaccgat cttcggcgc tggaggagct gttcgagggc 60
 gcggggcgca agctgtcgg aatgtcgaa ctgctgcgg tcgccccctt ctatcggtcg 120
 tgctggaaag acggcgcacgt cttcgactac gtcaacggcc aggacgagct ggaccgcccag 180
 atcgatgcggc gcaaccggc cgacaaggag ggctatcgcc gttcctggc ctattccag 240
 gacctgctga aggaaggcta tctgaagctg ggccgcgtgc ctttctggc cttcgccagc 300
 atgtcaagg cggcgccgg aatgtatgcgg ctccaggcct ggccgtcggt ctatgacaag 360
 gtcgcggct atatccagga cgagcatctg cgtcaggcct tcagcttca ctccctgctg 420
 gtggcgccga atccgttcgc cacctcatcg atctacgccc tggatccacgc gctggagcgg 480
 cgctggggcg tctgggttccc ggcggcggc accggcgcc 519

<210> 2

<211> 11991

<212> DNA

<213> Brevundimonas sp.

<220>

<221> CDS

<222> (10748)..(11518)

<400> 2

gaattccccg tgaagatgcg gggttcccg ggtcagacgg aaagacccta tgaaccttta 60
 ctatagcttc gccttggcgt tagcgaccgt atgtgttagga taggtggag actatgaaac 120
 cggggcgcca gctctggtgg agtcgtcctt gaaataccac ccttactgtc gttgacgtct 180
 aaccgaggac cgttatccgg tcccgacata tggcgtggtg ggttagttga ctggggcggt 240
 cgcctcccaa agtgtacgg aggcgcgca tggtgagctc agagcggtcg gaaatcgctc 300

gtcgagtgc aatggcataag ctcgcctgac tgcgagactg acaagtcgag cagagacgaa 360
agtccggccat agtgatccgg tggtcccgag tggaagggcc atcgctcaac ggataaaagg 420
tactctaggg ataacaggct gatTTGCC aagagtccat atcgacggca aagttggca 480
cctcgatgtc ggctcatcac atcctggggc tggagcaggt cccaaaggta tggctgtcg 540
ccatttaag tggtacgtga gctgggttca gaacgtcgtg agacagtttgc 600
gccgtgggtg ttcgaagctt gagaggatct gtccctagta cgagaggacc gggatggaca 660
tacctctgggt gtacctgtca tggcgccagc tgtgcagcag gtagctaaatgatgaaatag 720
ataaccgctg aaagcatcta agcggaaac taacctaaa acaaggcttc gctgaggatc 780
gtgaaagact accacgttga taggcccaggt gtggaagcgc ggcgacgcgt gaagcttact 840
ggtactaata atccgatcgg tttgatcggt tctcagcaaa actcattcga tgatcatcaa 900
tgacccgatg atcgtcacga caatgtcttc tcatcatccg ctgtccgcct cggtgacctg 960
gtggctatgt cggaggttcc ccacccgatc ccattccgaa ctcggcgtt aagccctcca 1020
gagccaatgg tacttcgtct caaggcgcgg gagagtaggt cgccgcggg tctaccaggc 1080
ggacagccga ttagtggaaaaa cctatcgaac ccttcttcct ccacaaacca cccctgccc 1140
gggatggagc agcccggttag ctcgtcaggc tcataacctg aaggtcgcag gttcaaattcc 1200
tgctcccgca cccaaacaat caagccgctg gatcaacgat ccagcggctt tttgctgcct 1260
gaaccccaa gcccgcgcccc ccatcccgga cccgaacgccc aagcgtcggc tctcaaggag 1320
tgaactggat cgtatgttcg aacggcgggt cgatcggcgc gccgcgcgtcg cgccgagggg 1380
cgctcgcgtt tccgttcatc agggccacag ccgcctcgcc gaacccgtag cccggacggc 1440
tctccgacag cacgacgcaa tccgagaccc ggccgtcggc acgcccataatg catcgagtc 1500
gaaccctgac gtcgtccaag acggcgcgtg aggattgggc ggccgccttgc atcccgccgg 1560
acgtcttggg ctgcgccttgc gcccggatcg cggcggcgcgc cggcgtcggaa ctgagggcgg 1620
caagagcga cagcaggcgcg aggggcattgg gccatttcct tctcacctat aaggcccgaa 1680
acgcccgtt gttcccttcg ccgacacaaa ggtcgccgaa caggcgttgc gccggcccgca 1740
agcagccttgc gatcaagact cgccgcgc aaaaacccac cagggccgc aggggggtgag 1800

gtggtgttcg tggtggcggc cgaagtggaa gcaggtgagc agggaaagaa cggggccgta 1860
gccgctgctg cggcgtggt gggcgtcggc gaacggctgg tcggtgtggc ggtgcggcag 1920
ccaggtgccg aaggtgaaga gctgaagcgc tgaaagcagg gccggcgcgg cccagaaggt 1980
caggagattg gccggccgca ccccccaggcc gaagagggcg atcaggacca gggcggtcag 2040
gaccgccatc tcgcgccagc cgaaataggt gcgaaagaag ttcaggaacc agggaaaggaa 2100
ggcgcggggc gccggggcgt aaaagtccgg gtcgtcggcc gtgcccggcgg cggcgtggc 2160
ggcgtggtgc gccgtttca gccgatcgaa gcggaagccc gcatagagcc ccagggtcag 2220
ccggccgact gcggcggtca gccgcggccg tcccggcgcc agggagccgt gcatggcgtc 2280
atggcgacg atgaaaaggc cgaccgacaa ccaggtctgg accgctacga tcgcccggac 2340
gatcaccaga ctggaggtgc cccagcgggt aaaatagacg ccgtagacgt gcaggctccc 2400
ccatcccgcc acgatcattc ccgcccagggt cagaccgatc caggtctggc gcgggacgat 2460
gcggggctcg gcgacggcgg cggcatggc cttgtttaa cccaggccgg cgtcggacgc 2520
atccggcgg cttgcccccc acgcccggcc gtgccacctg tcgcggatgc aggccgccc 2580
ccccacagt tccgcgccgg acctttgct gctggggggc ggcctggcca acggccttct 2640
ggccctgcgc ctgtcccagg tccggcccga actggacgtg cggatcgtgg aggcggccga 2700
ccggctggc gggatccata cctggtcctt cttcgaggcc gatctgacgc cggcgcagcg 2760
ggcgtggatc gcgcctcga tcgcctgtcg ctggccggc tattccgtgc gtttccggc 2820
gttcgaacgg cggttggtca ccggctattg cagcgtgacg gccgaacggt tcgcccggac 2880
ggtgacccag gccctggcgg ggcgcacgt caccggcgcc gccgtcgct cggccgggcc 2940
gaccgaggcg gtcctggcgg acgggcaccc gctgacggcc cggcgggtca tcgacggccg 3000
ggggccgacc gctgcgccgg acctggccct ggggtttcag aaattcgtcg gcctggaggt 3060
ggggctgacc gcgcctcact ggctgaagga accgatcgac atggacgcct gcgtcgatca 3120
gtcagggggc tatcgcttcc tctatgtcct gcccttcgac gaccggaccc tgctgatcga 3180
ggacacccgc tacaccgacg ggcgcaccc ggtacacgac ctgtccgaa cggcgtcag 3240
ggactacgcc gcgcagcggg gctgggtcat agagacggtt ctgcgcgagg aggaggggt 3300

gctgccggtc gccctggacg gcgacatcgc cgcccatctg aagcggctgg ggccgacggc 3360
gctgagcggc ctgcgcgccc gtctgttca tccgactacc ggctattccc tgccggacgc 3420
ggtgccggctg gcggatcatc tggcggagcg tatcgaagcg gcgcggacg gcccggccct 3480
ggcccaggc atccgtcgcc atgcgcgca cgtatggcg caaagaggct tttatcggt 3540
gctgaaccgc atgctgttc gggccgcgcg gccggatcag aggtacaggg tgctggagcg 3600
gttctatcgc ctgcctcagc cgctgatcga acgcttctat gcgggggaga cgacccttggc 3660
cgacaaggcg cgatcctca gcggcaaacc cccggtgccg atcggcgccg ccctgacctg 3720
tctggtcgaa agaggacgtg cgtgatgcga gcagcagtga tcggatcggg gttcgaaaa 3780
ctgtcgctgg ccattcgccct tcagacggcg gggatccaga ccacggtctt cgaggcgcc 3840
gacctgcccgg gcggccgggc ctatgtctat aaggacaagg gctataccctt cgacgcccggg 3900
ccgaccgtca tcaccgatcc ttcggcgctg gaggagctgt tcgagggcgc gggcgcaag 3960
ctgtcgact atgtcgaact gctgccggtc gcccccttct atcggctgtg ctggaaagac 4020
ggcgacgtct tcgactacgt caacggccag gacgagctgg accgcccagat cgtcgcccgc 4080
aacccggccg acaaggaggg ctatcgccgg ttcctggcct attcccagga cctgctgaag 4140
gaaggctatc tgaagctggg cggcgtgccc tttctggact tcgcccagcat ggtcaaggcg 4200
gcgccggagt tgatcggtct ccaggcctgg cggtcggtct atgacaaggt cgccggctat 4260
atccaggacg agcatctgca tcaggccttc agcttcaact ccctgctggt gggcggcaat 4320
ccgttcgcca cctcatcgat ctacggccctg atccacgcgc tggagcggcg ctggggcgctc 4380
tggttccgcg gcggcggcac cggcgccctg atccaggcca tggtgccgct gttcaggac 4440
ctggcggcg aaatccggct gaacagtccg gtcgagcggta tcaccctggc gaacggcgcc 4500
gccgacgggg tggtggtcg cggccaggcc ctggccttcg acatggcgcc ctccaatgcg 4560
gacgtggtcc acacctatca gcgcctgctg ggccaggagc cgccggccg caaggagggg 4620
gcgcgtctgg cctccaagcg gcattccatg tcctgttgc tcatttattt cgccctgaag 4680
cgggtccacc cggaggtcgcc ccaccacacg gtgcctttcg gcccgcgcta ccgcgagctg 4740
atcggcgaaa tcttcaaggg gccggacctg cccaggact tttccctcta tctgcacgcc 4800

ccgacccgca ccgatccgtc cctggcgccc gagggatgcg acgccttcta tgtgctggcg 4860
ccggtgccgc acctggcctc ggccgacatc gactggcg gg tcgaggggcc ggcctatcgc 4920
gaccgggtcc tggcctatct ggagcagcac tacattcccg gcctgacggc ccatctggac 4980
acctgcccga tcttcacgcc cgtggatttc cgccgaccaggc tgaacgccc ccagggctcg 5040
gccttctcgc tggagccgat cctgacccag agcgcctatt tccgcgtcca taatcgac 5100
gaccagatcc ccaacctcta ttcgtcggc gccggcaccc atccggcgcc gggcgtgccc 5160
ggggtggtgg gctcggccaa ggccaccgccc ggcttgcata tcgaagatgc gggcggacc 5220
gcatgagcga cgccgtcctg gaccacagcc gccagtcgat ggagcaggc tccaagagct 5280
ttgcggccgc cgcccggtcg tttccggcg ccattcggga cgacgcctgg atgttctacg 5340
cctggtgccg ccattgcgac gacgagatcg acggccaggt cctggccat gggcggcgtcg 5400
gcatcgaccc ggtcctggcg gggcgcaaac tggtcgaact gcgcgaacgc acggccgccc 5460
ccctggccgg agagccgcag acggacccgg tttcaccgc cttcagcgc gtcggccccc 5520
gccacgccc tccggcagag gaggcgatgg acctgttgca ggggttcgag atggacgtgg 5580
aggccgccc ctacgacacc ctggaggaca cgctggacta cgcctatcac gtcggccggcg 5640
tggtcggggt gatgatggcc cgatcatgg gggttcagga cgccgcgacc ctgcggccgc 5700
cccaggacct gggcctggcc tttcagctga ccaacatcgc ccgagacgtg gtggaggacg 5760
ccaagggcgg gcgggttat ctgcccggcc agtggctggc cgaggcggc gtggccgcgc 5820
accaggtcga tcagccccgg catcgtcagg ccgtcgccc tacggccag cggctggtgg 5880
cgccggcggc gccctattac gcctcgccgc gctggggctt gcgcgatctc aatccgcgt 5940
cgccctggc cgtcggccacg gcgcggggcg tctatcgcc catcgccgc cacgtctcgc 6000
gctcggccgc cacggcctgg gacggccggc cctcggtcga caaggcggc aagctggccc 6060
tggtggggcg cggggccctg atcaccctgt ggtgcaagac cctggacgcc tggcgtgaac 6120
cgccgcccgc cccggccctg tggacccaca tctgacggcg ctcagcgc cggcgtctg 6180
tgctccatca tcacggccag ggcgatcccg gccagaccca cgccgcccag ggcggccccc 6240
ccggccagga cccggcgtt gaagtgcggc cgccagatca gggcctgata ggtctccacg 6300

gccaggcat gggcggtat ccagcccagg gcgcggaagg ctgcggcat caggaagcgc 6360
ggcgccatcg acccgccccag ggccgccagc agcagggcga cgaagggttgt cagggctgg 6420
gcctgttcgc gcgaccgaca ggccgccgtc agggccaggg ccaccccccgc cgccacagg 6480
gcgaccaggc cggcggtcag gagcgccgccc gccgcctgcc aaaacgcaag atccggcagc 6540
cgaggccagg ccgccaggaa acggccgccc gactgcatca ggccgaccgt cgtcagccag 6600
atcgccccgtc ccgcagttat gggcgccgtc ccgcggccgc ccagggccag ccgcgcctgc 6660
aggcccggc gccgttcgtc caacccgccc atggcgcgt gcatggcggc gaagaagacg 6720
aacatcacgc tgaccgcccc ggcgtaatag gcggccttggc cgtgccttgc cggcccccacc 6780
tggcgacgg ggacgtcgcg cgacgggggc gcggggccgac cggccaggcgc cggccggca 6840
gggaccagcc gcgcctgaag cgccgcccgc gccacgtctc gacccgcccgc cgacaccacc 6900
gtcagctggg gcgcgcctgc atcgtcgccgg gtgatcagaa cgccggcgtc ggcgcggccg 6960
tcgatcacgg cccgctccac gcgcctggcg tcgtccagac ggcgaaggcgc cggcccccaga 7020
tcccgcaca gcgcctcgcc gacggcggcc gcggccgggg tgccgcgcgc atcgtgcagg 7080
gccacgctgg cgtcgatgtc gccacgcgcgc ccggcgccga agacggcggc gaacagcaga 7140
tagaccaggc gcggcaaaac cagggtcagg gccatgcccgc aacggtcccgc ccagaagccg 7200
cgcccccagg cgcccgccac cgccatcatg acgaggcggtc cgacagatgg ggcaccagg 7260
cgtccaggcc gggcgacgc acggcgaccc cgcgccttc ggcgtccgc tcggcgaaa 7320
ccctctggc cgcccccagg gcgtccctgc acagcagccgc ccattccagc ccgtccctgg 7380
aggcgccag acccgactgg gcgaaccggc tcgcggccag gcgcgaggcgc ggccgcggca 7440
gttgacgac cagcagccgc gccaggccga aggctgacg cagcaggccgc ttggcggtc 7500
cttccgcag cagccggccc tggccagga cgccgatccg atcggccgtc tcggagacga 7560
aggcctcggtc gtggctgatc agcagacagc cggcccccgc ctggaccgtc tcgcgcagg 7620
cggacgacag gacgacgcgg gcggcggtc ccaccccttc ggtcggttcg tcggcgatca 7680
gcaggcgccgg gcgcggcacc agggcgccgc tgaggttggc gcgcgcacgc catccgccc 7740
acagtgaatg aaccggctcg tccgcctgg gggcgcatcc ggtcaggcgc agggcccgct 7800

ccaccgcccgc agggcggttg gaacggggaa ggccgcacag ggccgcgacc gccgcgacgt 7860
tctcgccgg cgtcagggcg ggaaagaggg cgcaagtctg gggcgcaagg ccgatgcgtc 7920
cgcgacgggg cgcccttcg ccggccgtcg cccgcccgcg ccggacgggg atcaggccgc 7980
aggccacccg agccgcccgtg gacttgcccg ccccggttcgg acccagcagg gcgtaaacct 8040
ctccggccgc gacggtcagg ttgaaatcgc gcagcaccgg cccttcgccc tagccgcct 8100
cgacgtcctt cagaaccagc gccggcgca cgctagcgtc caagttcggc ctgcccgaag 8160
agatgaagga cataggtcgt cagggggctg tcgtgcccga ccgcctcggc cgcccgggcc 8220
agtgactggc gcaccccgcc gcggaccggg cttcgcccc acaggtccac gaaggtggtc 8280
acgcctgat cctgaccac gtccttgccc aaggcctcgc tcgtcgaaca ggcgtccatc 8340
aggtcgtcgc aaagctggaa ggcgaagccg accgcttcgc cgaaggcggc gagacgcgcc 8400
aggtcgtccg catcgccgccc gcccatccgg ccgcccgcgc gacgaacagg 8460
gcgcgggtct tcagatcggtt gatccgacgc agggcgacca cgtcgcgtc aacggatcg 8520
tcgcgcagat cgccatctg gccctcgccaggccgtcga agccgatcgc ctgcgtcaaa 8580
tcgtccaggcg cgcctccgac ggcggccggc tttcagaat cagccgggtc 8640
gattggttca aaagggccac ggccgcccagc acggccgcat cctcgccgtg gcggcgggtc 8700
aggtcggct gaccgcgccc caaggccgca tcatccatac agggcaggtc gtccagaacc 8760
aggaggcgg catggccat ttgcaccgcg caaccgaaat ccagggcgtc ctggccccc 8820
ccgcccacgt gcgcggcggc caacatggcc acgaccggcc tgacccgctt gcccggtccc 8880
agcagggcct cgccgcggc gagggtctaa agaccgtccg atgagggcgc cgtctcgcc 8940
agccggcct gcaccaggcc acgcagattc tcggcgact gaggttcggg gtccgacacg 9000
ggctggggcc ttaagccgac gatgccata cgggtctcct gatgtccttc gacagtgcgc 9060
ttgcgaccct gggctgacgc attatgatca catacggcat cacgactgcg tcggatgcaa 9120
cccgccagag catgatcggtt tcggaggaa ccgctaggag cggttgcgt gcccacccccc 9180
gacgacgccc tgcgtccgacg caaggacgaa cacatcgacc acgtgcgggc cggacgggggt 9240
ctcagcggcgc cgtcctcggtt actggaggcg gtgcgtttcg tccatgacgc ctgcggac 9300

ctggccctcg accagatcga cctgtccgcc cgtttcctgg ggcggcggct gaacctgccc 9360
 ttcctgtatca gttcgatgac cggcggcccg tcgcggcccg aggcgatcaa tgcgcggctg 9420
 gccgaggcgg cccaggccct gggcgtggcc ctggcggctcg gctcccagcg cgtcgcctg 9480
 gagacggccg gcgggtccgg cggtcgggc ttggggccgg atctgcgccc ccggcgccc 9540
 gacgccctga tcctggccaa tctggggcgt gtgcagttcg ccctggctta tgggtggac 9600
 gaggcgcgcc gggccatgga gatgatcgcc gccgacgccc tgatcctgca tctgaatccg 9660
 cttcaggaag gcgtccagcc cgagggcgac cgcgactggc gcggcgtggc ccagggatc 9720
 gagcggatcg ccgcccctt tccgggcccag gtggtggtca aggagaccgg cgccggcctg 9780
 tcggccgccg tcgcccggcg cctggccgac atggcgtcg cggccctgga cgtggcgggg 9840
 gcggcggca ccaactgggg cctgatcgaa gggcgcggg ccaccggcgg gcgggcccag 9900
 gccttggccg ccccttcgc cgactgggg gtgccgacgg cccgcagcct ccgcgactgc 9960
 gcccaggccg ccccgaccc gggctgatc ggctcggcgg gatcaagga cggcttggat 10020
 gcggcccgcg ccgtccgcct gggggccgat ctggcggcc aggccgcgg ggtgtggag 10080
 gcggccctga cctcgaccca ggcggtggtc gatcattcg agctgatggc ggccagctg 10140
 cggctcgccct gttctgcac gggctccgcc gatctggcgg ccctcgctca ggccggctg 10200
 ctggaagagc cccgcttctg agccagttcg gccttcagcg cccgcgcga ccgcacccac 10260
 agaaagccga aggagacgca gccttcgcgc gtgcgcacgg cgtgatgcag acggtgcc 10320
 tggatgcgcc gcgtccagaa gccggaccgc ccggaaaagc ccgtcgggaa ccggccgtgc 10380
 accaggccgt cgtgaaagaa gaaatagacc atccatagg ccgtgatccc caggccgacc 10440
 ggcagggccc agggccacag gtgcagaccc acggccacca tgacgatggc cggggcggcg 10500
 aagaccacgg cgaacaggcgt gttcttcac aggggggtgat cgtcggctc atgatggctg 10560
 cggtgcagg accacaggaa accgtgcac acatagcggt gcatgatcca ggcgaacgcc 10620
 tccatgccc aaaaaggcggt caggaacagc gcgatccacg tcagccaggc catggcccca 10680
 gcataggcgg tttgatccgc cttcgccacg acttgaccgc cgcaggatt tgaccgtctg 10740
 tgccccc atg ttg agg gat ctg ctc atc acc acc ctg gcg ctg agc ctg 10789
 Met Leu Arg Asp Leu Leu Ile Thr Thr Leu Ala Leu Ser Leu

1

5

10

atc atc ggc ctg cgc tat ctg ctg gtc ggc gcg gcg gcc cat ggg ctg 10837
 Ile Ile Gly Leu Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala His Gly Leu
 15 20 25 30

ctg tgg gcc ggg gcg ggc cgg gga cgg gcg ctg aac ctg cgg ccg ccg 10885
 Leu Trp Ala Gly Ala Gly Arg Gly Arg Ala Leu Asn Leu Arg Pro Pro
 35 40 45

gcg atg aag cgc atc cgc gcc gag atc gtc gcc tcc ctg atc gcc tgc 10933
 Ala Met Lys Arg Ile Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Leu Ile Ala Cys
 50 55 60

ccc atc tac gcc ctg cgc gcc ctg gtg ctg gag ctg tgg aag cgg 10981
 Pro Ile Tyr Ala Leu Pro Ala Ala Leu Val Leu Glu Leu Trp Lys Arg
 65 70 75

ggc ggg acg gcg atc tac agc gat ccc gac gcc tgg ccc ctg tgg tgg 11029
 Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Ser Asp Pro Asp Ala Trp Pro Leu Trp Trp
 80 85 90

ctg ccg gtc agt ctg atc gtc tat ctg ctg gcg cac gac gcc ttc tac 11077
 Leu Pro Val Ser Leu Ile Val Tyr Leu Leu Ala His Asp Ala Phe Tyr
 95 100 105 110

tac tgg gtg cac agg gcc ctg cat cac ccg cgc gtc ttc ggc tgg gcc 11125
 Tyr Trp Val His Arg Ala Leu His His Pro Arg Val Phe Gly Trp Ala
 115 120 125

cat gcc gaa cac cac ccg tcg cgc gac ccc agc gcc ttc gcc tcc ttc 11173
 His Ala Glu His His Arg Ser Arg Asp Pro Ser Ala Phe Ala Ser Phe
 130 135 140

gcc ttc gac ccg gcc gag gct gcg gcc acc gcc tgg ttc ctg ccc gcc 11221
 Ala Phe Asp Pro Ala Glu Ala Ala Ala Thr Ala Trp Phe Leu Pro Ala
 145 150 155

ctg gcc ctg atc gtg ccg atc cac tgg ggc gtg gcc ctg acc ctg ctg 11269
 Leu Ala Leu Ile Val Pro Ile His Trp Gly Val Ala Leu Thr Leu Leu
 160 165 170

acg ctg atg tcg ctg acg gcc gcc ctg aac cat gcg ggg cgc gag gtc 11317
 Thr Leu Met Ser Leu Thr Ala Ala Leu Asn His Ala Gly Arg Glu Val
 175 180 185 190

tgg ccc gcc gcc tgg ctg gag cgg gcg ctt cgc tgg ctg atc acc 11365
 Trp Pro Ala Ala Trp Leu Glu Arg Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ile Thr
 195 200 205

gcc acc cac cac gac gcc cac cac aag cggttc aac gga aac tac ggc 11413
 Ala Thr His His Asp Ala His His Lys Arg Phe Asn Gly Asn Tyr Gly
 210 215 220

ctc tat ttc cag ttc tgg gac cgcc tgg gcc ggg act gag gtt tcg gcc 11461
 Leu Tyr Phe Gln Phe Trp Asp Arg Trp Ala Gly Thr Glu Val Ser Ala
 225 230 235

gcc ccc tcg cca cca tcc ccg gtc atc cct cca gag cgccccc tca gcg 11509
 Ala Pro Ser Pro Pro Ser Pro Val Ile Pro Pro Glu Arg Pro Ser Ala
 240 245 250

cct ctt cgg tgatcggtt ggtcaggcg ggcgtggcg cccaggccgg 11558
 Pro Leu Arg
 255

tcgccccatctg cagtatggac gacgaggcca gacgtcccc gccgctcatg gcgatgaccc 11618
 gcagggagtc cctcaaatgc cgggtgtcca tcatgaaatgtt cagcccgctcg cggtccggca 11678
 tcagaatgtc caccagcacg gcgtcggcg accagtcctc gacgatccgc aaccgtcgt 11738
 tgaccgttgc tgcggtcagg acttggcaac ccagccgtt cagcatctcc tccagatgaa 11798
 gcagaaccag cgaatcggtcc tcgatcacgc agacttcac gcccaacctc cagatgcgt 11858
 caggggaac taacggatga atccatgtt gcgtcaactc ggaagacggc gtttccgact 11918
 ggccatcgcc ttggcggcg cggtcggtac cctgcttctg gcggccactg gggtgacgct 11978
 gcaacgagaa ttc 11991

<210> 3
 <211> 774
 <212> DNA
 <213> Brevundimonas sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(771)

<400> 4
 atg ttg agg gat ctg ctc atc acc acc ctg gcg ctg agc ctg atc atc 48
 Met Leu Arg Asp Leu Leu Ile Thr Thr Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ile
 1 5 10 15

ggc ctg cgc tat ctg ctg gtc ggc gcg ggc cat ggg ctg ctg tgg 96
 Gly Leu Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala His Gly Leu Leu Trp

| 20 | 25 | 30 | |
|--|--------------------------|----|-----|
| gcc ggg gcg ggc cg ^g gga cg ^g g ^g ctg aac ctg cg ^g cc ^g gc ^g atg Ala Gly Ala Gly Arg Gly Arg Ala Leu Asn Leu Arg Pro Pro Ala Met | 35 40 45 | | 144 |
| aag cg ^c atc cg ^c gcc gag atc gtc gcc tcc ctg atc gcc tgc ccc atc Lys Arg Ile Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Leu Ile Ala Cys Pro Ile | 50 55 60 | | 192 |
| ta ^c gcc ctg cc ^g gc ^c ctg gt ^g ctg gag ctg tgg aag cg ^g gc ^g g ^g Tyr Ala Leu Pro Ala Ala Leu Val Leu Glu Leu Trp Lys Arg Gly Gly | 65 70 75 80 | | 240 |
| ac ^g gc ^g atc ta ^c agc gat ccc gac gc ^c tgg ccc ctg tgg tgg ctg cc ^g Thr Ala Ile Tyr Ser Asp Pro Asp Ala Trp Pro Leu Trp Trp Leu Pro | 85 90 95 | | 288 |
| gtc agt ctg atc gtc tat ctg ctg gc ^g cac gac gc ^c ttc tac tac tgg Val Ser Leu Ile Val Tyr Leu Leu Ala His Asp Ala Phe Tyr Tyr Trp | 100 105 110 | | 336 |
| gt ^g cac agg gc ^c ctg cat cac cc ^g cg ^c gtc ttc g ^g gc ^c cat gc ^c Val His Arg Ala Leu His His Pro Arg Val Phe Gly Trp Ala His Ala | 115 120 125 | | 384 |
| gaa cac cac cg ^g tc ^g cg ^c gac ccc agc gc ^c ttc gc ^c tcc ttc gc ^c ttc Glu His His Arg Ser Arg Asp Pro Ser Ala Phe Ala Ser Phe Ala Phe | 130 135 140 | | 432 |
| gac cc ^g gc ^c gag g ^c t ^g gc ^g acc gc ^c tgg ttc ctg ccc gc ^c ctg gc ^c Asp Pro Ala Glu Ala Ala Ala Thr Ala Trp Phe Leu Pro Ala Leu Ala | 145 150 155 160 | | 480 |
| ctg atc gt ^g cc ^g atc cac tgg g ^g gc ^g ctg acc ctg ctg ac ^g ctg Leu Ile Val Pro Ile His Trp Gly Val Ala Leu Thr Leu Leu Thr Leu | 165 170 175 | | 528 |
| at ^g tc ^g ctg ac ^g gc ^c ctg aac cat gc ^g g ^g cg ^c gag gtc tgg ccc Met Ser Leu Thr Ala Ala Leu Asn His Ala Gly Arg Glu Val Trp Pro | 180 185 190 | | 576 |
| gc ^c gc ^c tgg ctg gag cg ^g gc ^g cc ^g ctt cg ^c tgg ctg atc acc gc ^c acc Ala Ala Trp Leu Glu Arg Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ile Thr Ala Thr | 195 200 205 | | 624 |
| ca ^c cac gac gc ^c cac cac aag cg ^g ttc aac gga aac tac g ^g ctc tat His His Asp Ala His His Lys Arg Phe Asn Gly Asn Tyr Gly Leu Tyr | 210 215 220 | | 672 |

ttc cag ttc tgg gac cgc tgg gcc ggg act gag gtt tcg gcc gcc ccc
 Phe Gln Phe Trp Asp Arg Trp Ala Gly Thr Glu Val Ser Ala Ala Pro
 225 230 235 240

tcg cca cca tcc ccg gtc atc cct cca gag cgg ccc tca gcg cct ctt
 Ser Pro Pro Ser Pro Val Ile Pro Pro Glu Arg Pro Ser Ala Pro Leu
 245 250 255 268

cg^g tga
 Arg 774

<210> 4
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Brevundimonas sp.

<400> 4
 Met Leu Arg Asp Leu Leu Ile Thr Thr Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala His Gly Leu Leu Trp
 20 25 30

Ala Gly Ala Gly Arg Gly Arg Ala Leu Asn Leu Arg Pro Pro Ala Met
 35 40 45

Lys Arg Ile Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Leu Ile Ala Cys Pro Ile
 50 55 60

Tyr Ala Leu Pro Ala Ala Leu Val Leu Glu Leu Trp Lys Arg Gly Gly
 65 70 75 80

Thr Ala Ile Tyr Ser Asp Pro Asp Ala Trp Pro Leu Trp Trp Leu Pro
 85 90 95

Val Ser Leu Ile Val Tyr Leu Leu Ala His Asp Ala Phe Tyr Tyr Trp
 100 105 110

Val His Arg Ala Leu His His Pro Arg Val Phe Gly Trp Ala His Ala
 115 120 125

Glu His His Arg Ser Arg Asp Pro Ser Ala Phe Ala Ser Phe Ala Phe
 130 135 140

Asp Pro Ala Glu Ala Ala Ala Thr Ala Trp Phe Leu Pro Ala Leu Ala
 145 150 155 160

Leu Ile Val Pro Ile His Trp Gly Val Ala Leu Thr Leu Leu Thr Leu
 165 170 175

Met Ser Leu Thr Ala Ala Leu Asn His Ala Gly Arg Glu Val Trp Pro
 180 185 190

Ala Ala Trp Leu Glu Arg Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ile Thr Ala Thr
 195 200 205

His His Asp Ala His His Lys Arg Phe Asn Gly Asn Tyr Gly Leu Tyr
 210 215 220

Phe Gln Phe Trp Asp Arg Trp Ala Gly Thr Glu Val Ser Ala Ala Pro
 225 230 235 240

Ser Pro Pro Ser Pro Val Ile Pro Pro Glu Arg Pro Ser Ala Pro Leu
 245 250 255

Arg

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

tacgaattcg atgccccctcg ccctg

25

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

tagaggatcc tcaaggagtg aactggatcg ta

32

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

tacgaattcg atgaccggcg ccgtcg

26

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

tagaggatcc tcaagactcg ccgcgccaca a

31

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

tagaattcg ctgtcgccga tgcaggc

27

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

tagaggatcc tgcgggttcag cagccgataa aa

32

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11
tacgaattcg atgcgagcag cagtgtatcg a

31

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
tagaggatcc aagctttgg agccctgct

29

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
tacgaattcg atgagcgacg ccgtcct

27

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
tagaggatcc tcagatgtgg gtccacagg

29

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15

出証特2004-3115777

tacgaattcg atgatggcgg tggcggc

28

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16
tagaggatcc cccacatctg acggcgct

28

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17
tacgaattcg atgtccttca tctcttccgg c

31

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18
tagaggatcc accgccatca tgacgagg

28

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19
tacgaattcg atggcgatcg tcggcttaa

29

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20
tagaggatcc ctagcgtcca agttcggcct

30

<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21
tacgaattcg atgcccaccc ccgacgacg

29

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22
tagaggatcc tcagaagcgg ggctttcca

30

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23
tacgaattcg atggcctggc tgacgtggat

30

<210> 24

出証特 2004-3115777

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24
tagaggatcc tcaggcgccg ctgctggaa

29

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25
tacgaattcg atgttgaggg atctgctcat ca

32

<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26
tagaggatcc tcaccgaaga ggcgctgag

29

<210> 27
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27
tacgaattcg atgctgaaac ggctgggtt

29

<210> 28
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

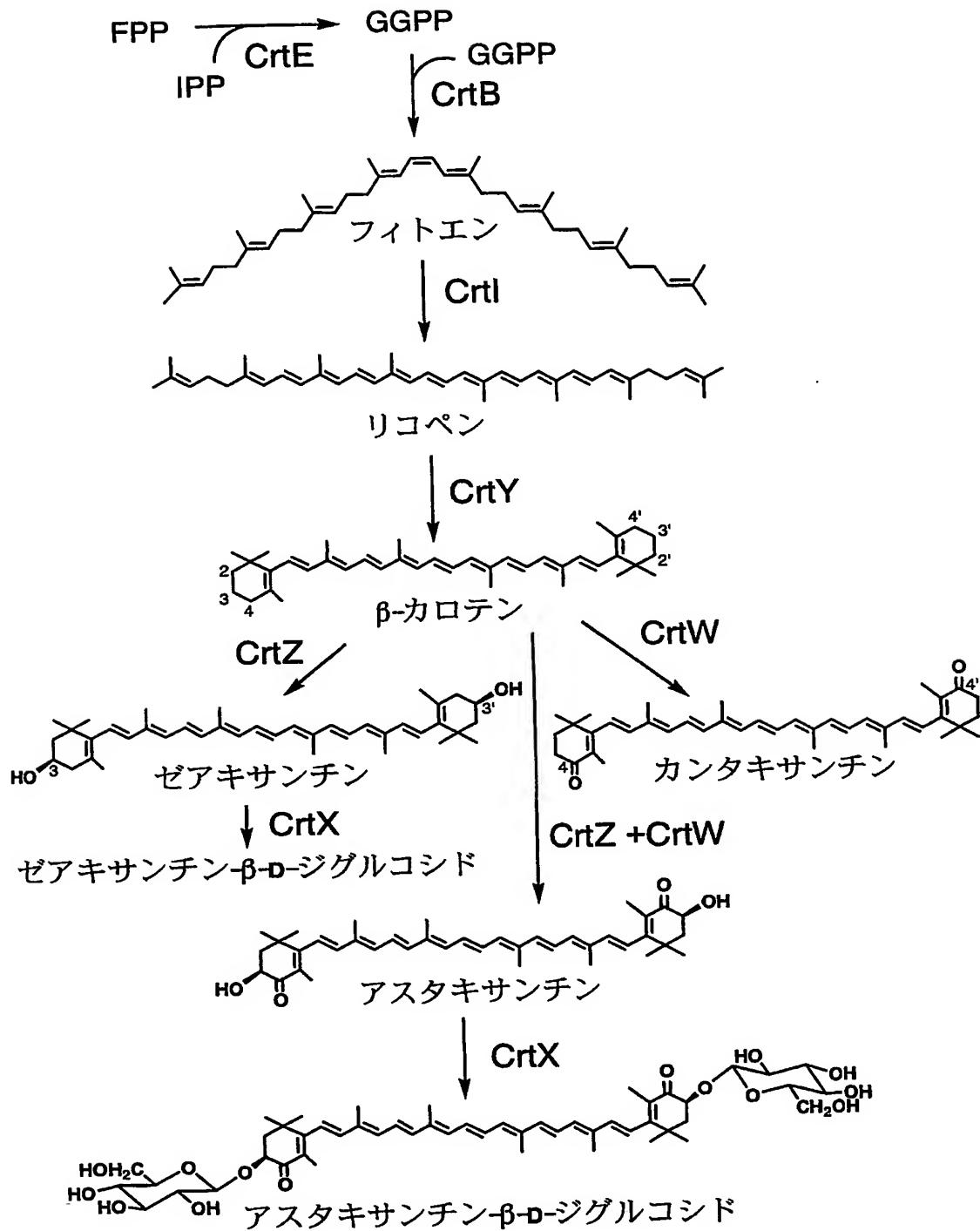
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

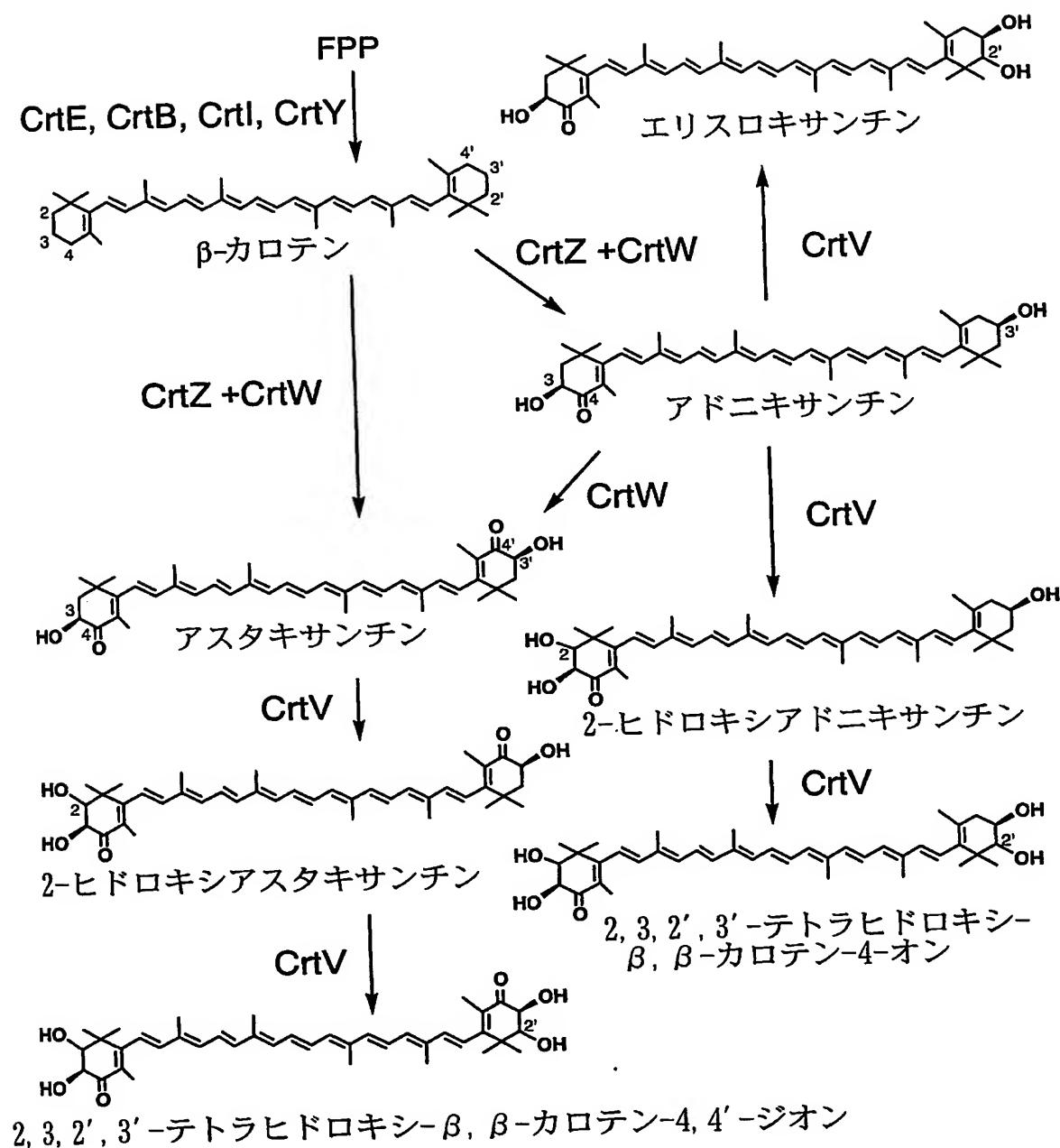
tagaggatcc ctattccag ttctgggacc g

31

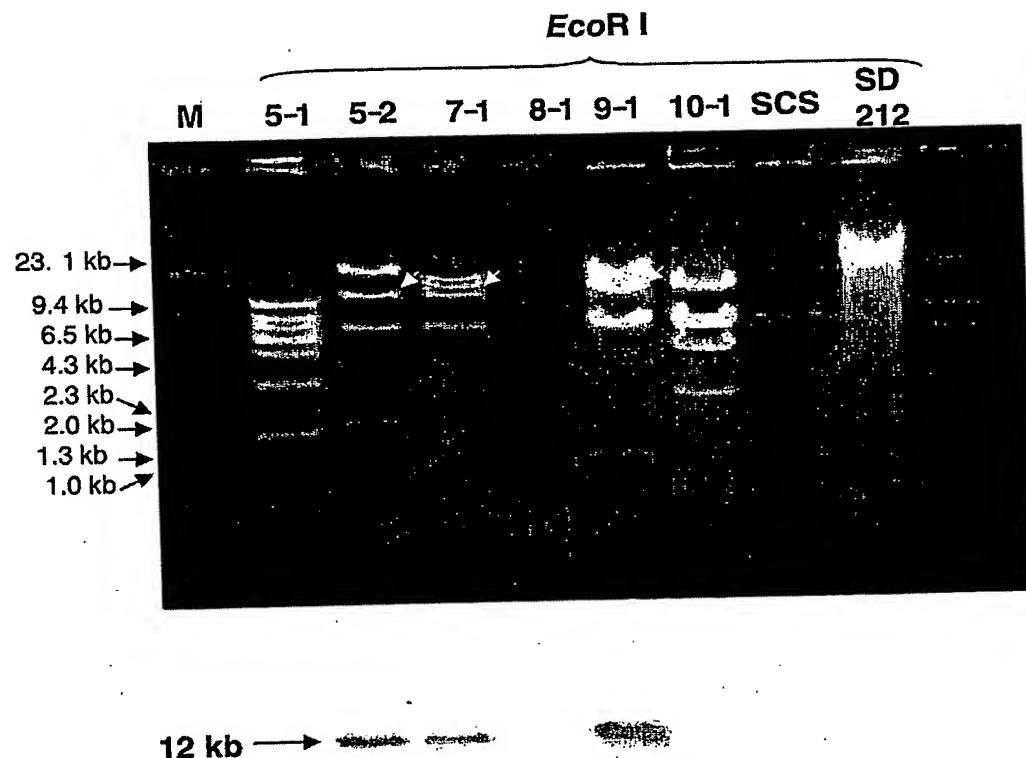
【書類名】図面
【図 1】



【図2】



【図3】

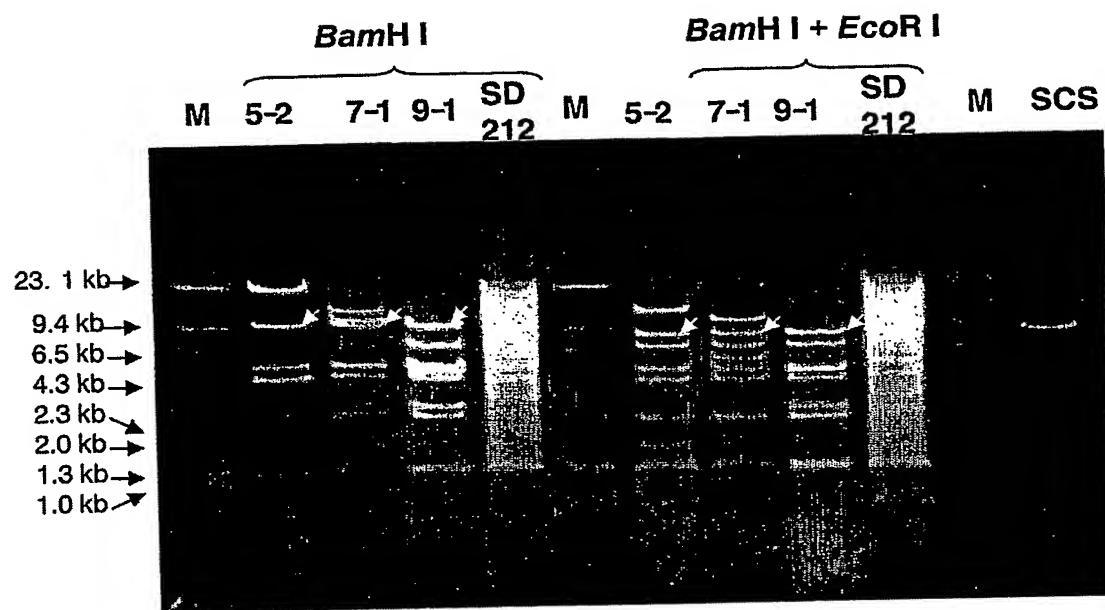
M: サイズマーカー (λ / *Hind* III - ϕ *X174/Hae* III digest)

5-1~10-1: コスミドクローン

SCS: コスミドベクター SuperCos1

SD212: SD-212 染色体DNA

【図4】



M: サイズマーカー (λ / *Hind* III - ϕ X174/*Hae*III digest)

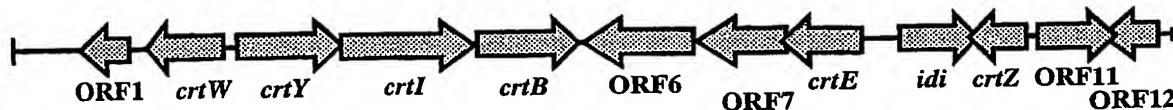
5-2~9-1: コスミドクローン

SD212: SD-212 染色体 DNA

SCS: コスミドベクターSuperCos1 の *Bam*H I / *Eco*R I 消化物

【図 5】

Brevundimonas sp. SD-212 のカロテノイド生合成遺伝子群 (12 kb-EcoRI 断片) の構造



アスタキサンチン生合成遺伝子群

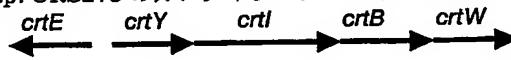
Agrobacterium aurantiacum (Paracoccus sp. MBIC01143)



Erythrobacter longas Och 101



Bradyrhizobium sp. ORS278 のカンタキサンチン 生合成遺伝子群



ゼアキサンチン 生合成遺伝子群

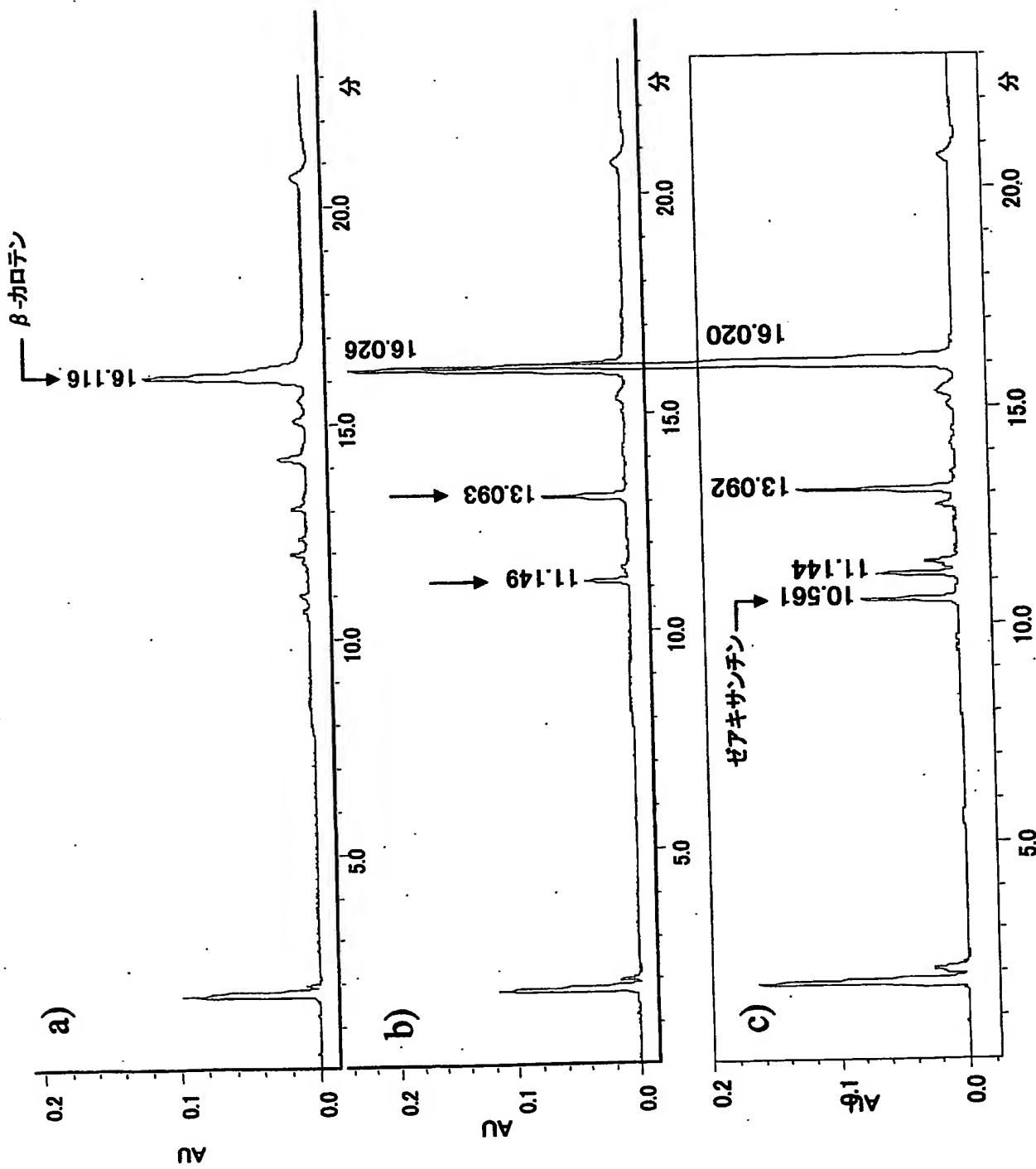
Erwinia uredovora 20D3 (Pantoea ananatis)



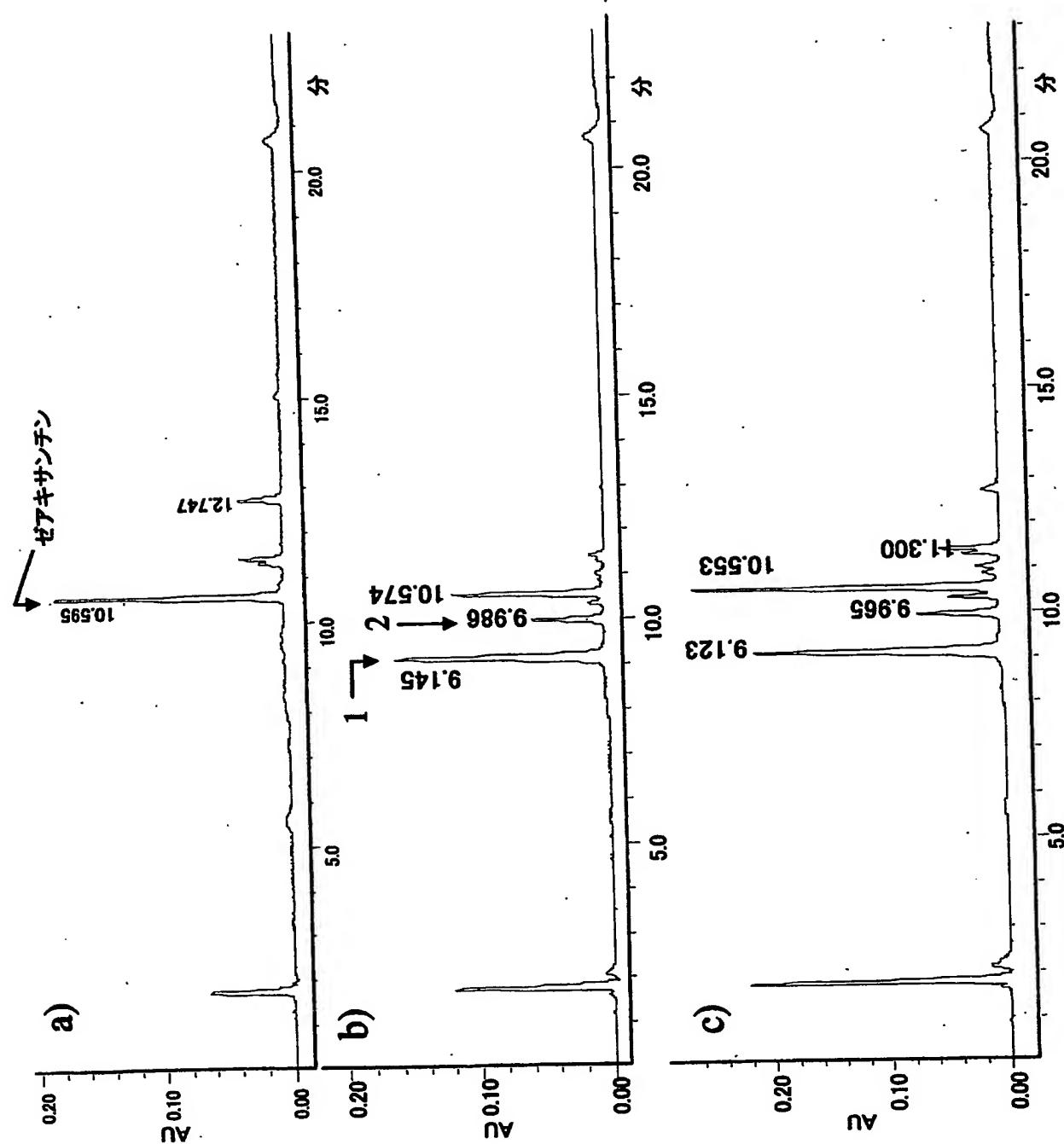
Xanthobacter autotrophicus Py2



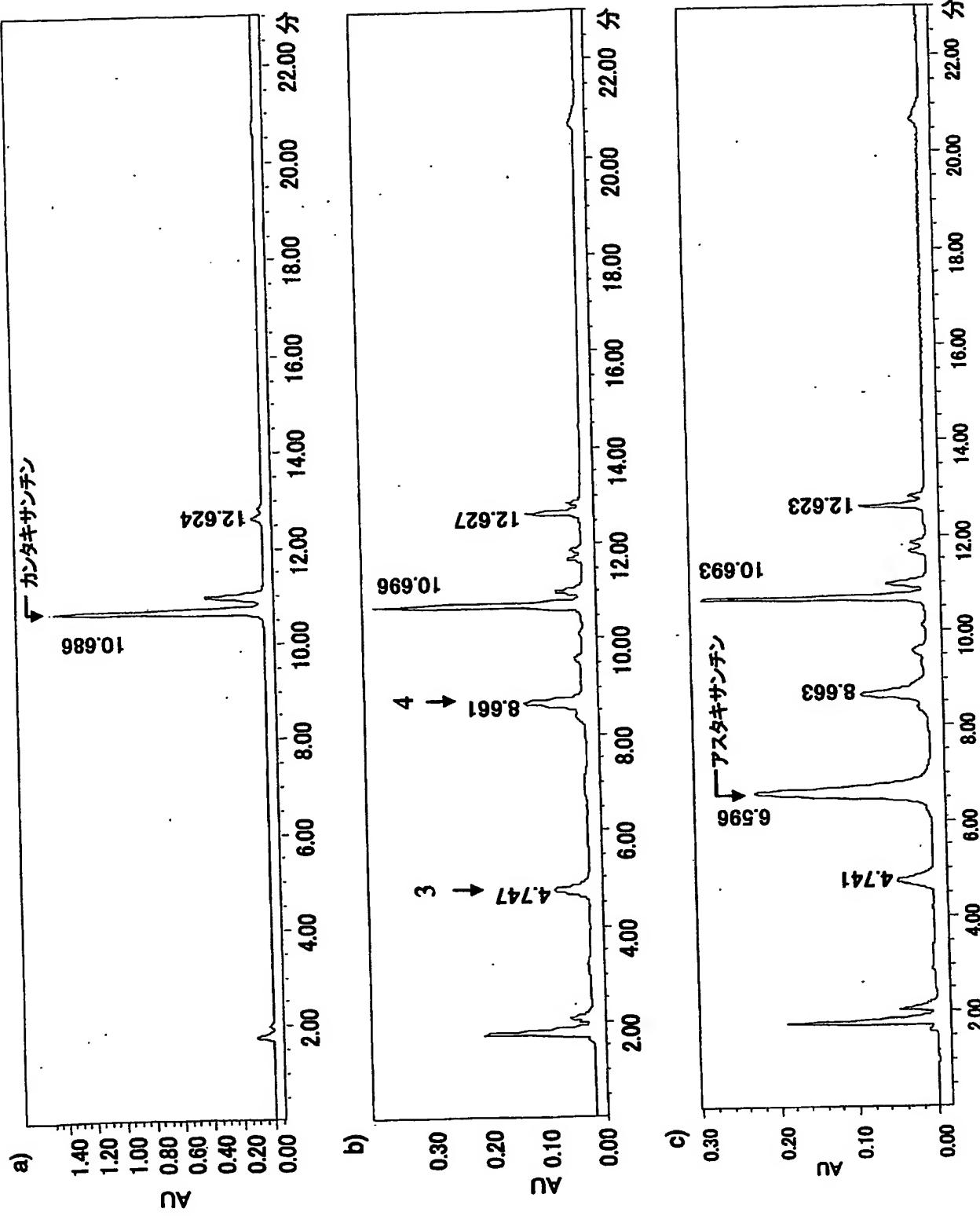
【図 6】



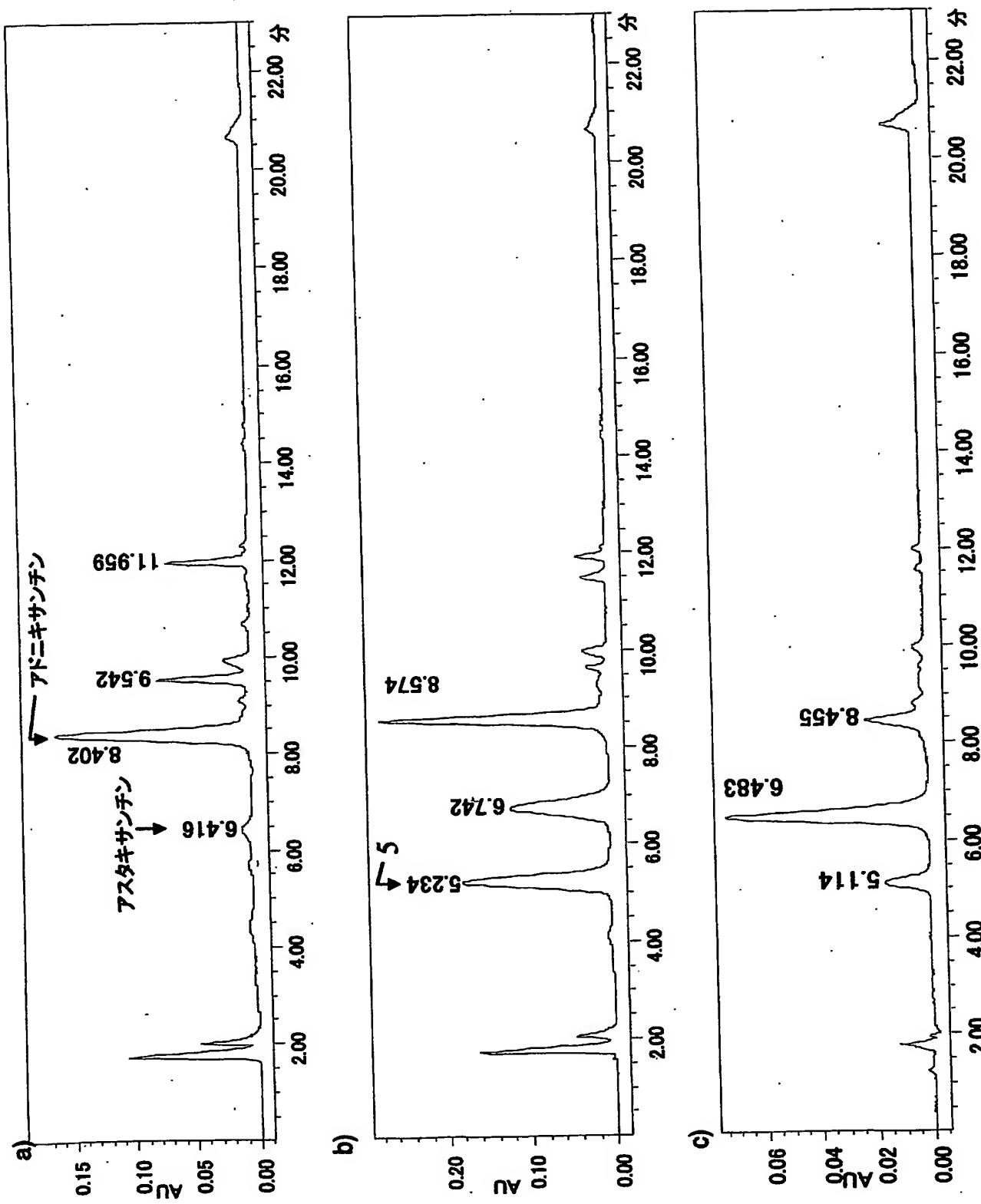
【図7】



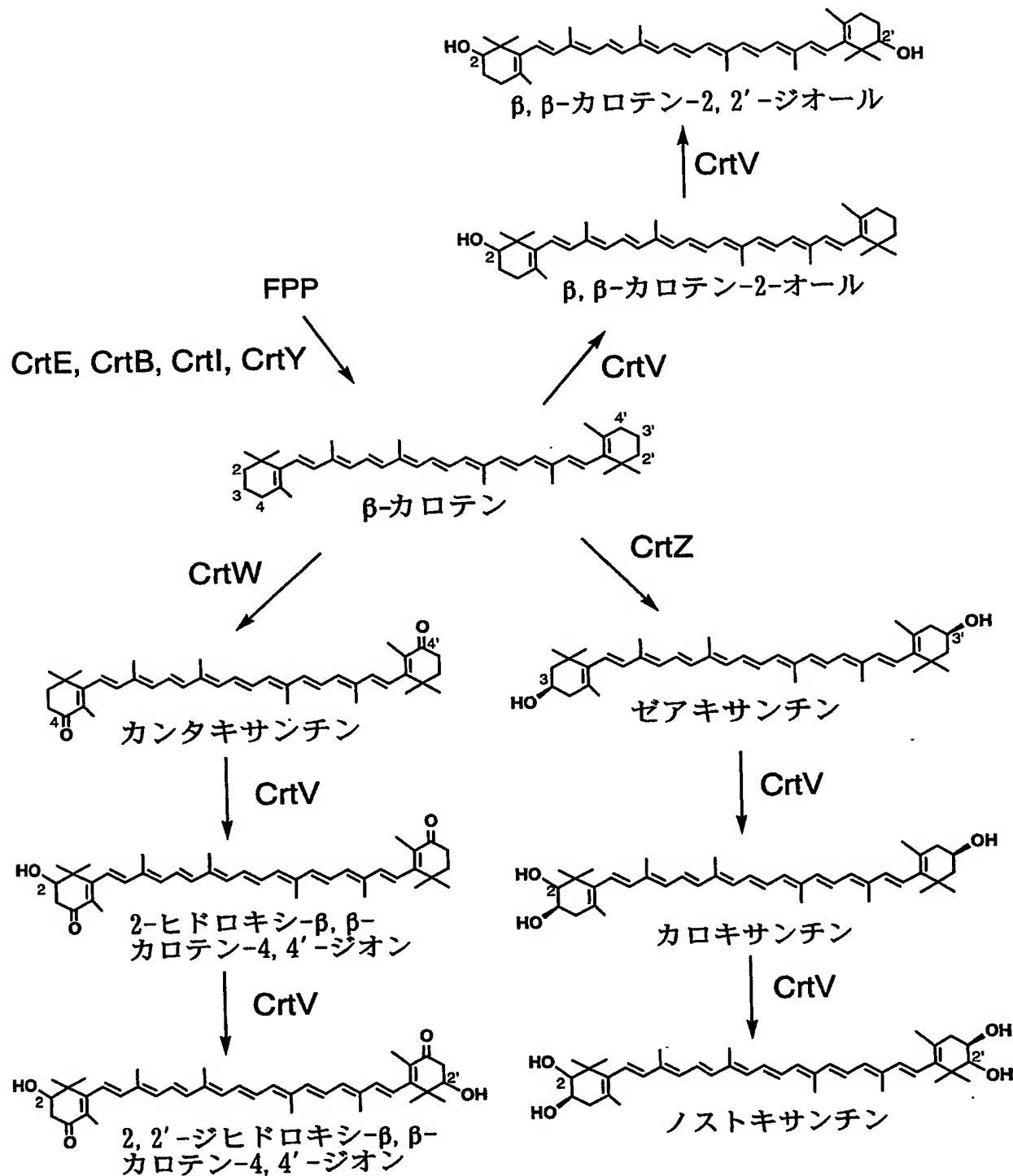
【図 8】



【図9】



【図10】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 自然界に微量しか存在しない β -イオノン環の2(2')位の炭素に水酸基が導入されたカロテノイドを大量に製造できる手段を提供する。

【解決手段】 プレバンディモナスSD-212株から得られ、 β -イオノン環-2-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、及びそれをコードする遺伝子。

【選択図】 なし

特願 2004-165919

出願人履歴情報

識別番号

[591001949]

1. 変更年月日

2003年 4月23日

[変更理由]

住所変更

住 所

岩手県釜石市平田第3地割75番1号

氏 名

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.